

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU

FARMACEUTSKO-BIOKEMIJSKI FAKULTET

Ana Pavlović

**REGULATORNI ZAHTJEVI U ISPITIVANJU VIRUSNIH ONEČIŠĆENJA U
PROIZVODNJI CJEPIVA**

Specijalistički rad

Zagreb, 2019.

Poslijediplomski specijalistički studij Razvoj lijekova

Mentor rada: izv. prof. dr. sc. Maja Šegvić Klarić i izv. prof. dr. sc. Jasmina Lovrić

Specijalistički rad obranjen je dana 15. ožujka 2019. u Zagrebu na Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu, pred povjerenstvom u sastavu:

1. doc. dr. sc. Sandra Šupraha Goreta, Sveučilište u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijski fakultet

2. izv. prof. dr. sc. Ivan Kosalec, Sveučilište u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijski fakultet

3. dr. sc. Ivica Malnar, znanstv. Sur HALMED, Zagreb

Rad ima 94 lista.

Rad je izrađen pod stručnim vodstvom izv. prof. dr. sc. Maje Šegvić Klarić u Zavodu za mikrobiologiju i izv. prof. dr. sc. Jasmine Lovrić u Zavodu za farmaceutsku tehnologiju Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta u sklopu specijalističkog poslijediplomskog studija „Razvoj lijekova“.

SAŽETAK

CILJ ISTRAŽIVANJA

Cilj ovog specijalističkog rada je pregledno opisati regulatorne zahtjeve koji su propisani s ciljem osiguravanja cjepiva od virusnih onečišćenja, a što značajno određuje kakvoću i sigurnost primjene cjepiva. Prikazat će se konvencionalne metode detekcije virusa kao stranih agensa u cjepivima te usporediti sa suvremenim metodama. Također će se opisati razvoj suvremenih metoda za detekciju potencijalnih virusnih onečišćenja.

MATERIJAL I METODE

Metoda istraživanja teorijskog rada temelji se na pretraživanju literature elektroničkim putem. Pretražene su bibliografska baza podataka (PubMed) i baza podataka s cjelovitim tekstom (Science Direct). Literatura je pretražena prema temi istraživanja, predmetu istraživanja i časopisu. Informacije o odobrenim cjepivima prikupljene su pretraživanjem raspoloživih *online* baza podataka Agencije za lijekove i medicinske proizvode (HALMED), Europske agencije za lijekove (EMA) i Američke agencije za hranu i lijekove (FDA). Pretraživanjem mrežnih stranica HALMED-a, EMA-e i FDA-a te Svjetske zdravstvene organizacije (SZO) i Međunarodne konferencije o harmonizaciji (ICH) dobiven je uvid u regulatorne smjernice vezane uz cjepiva. Prikupljeni podaci su kritički sagledani te sveobuhvatno prikazani kao pregledni rad kako bi se prikazala važnost primjene zakonskih okvira s ciljem osiguravanja cjepiva od onečišćenja stranim agensima.

REZULTATI

Cjepiva su imunološki lijekovi za aktivnu imunizaciju protiv patogenih mikroba (virusa, bakterija i parazita), a dobivaju se od živih (oslabljenih) ili mrtvih mikroba, njihovih toksina ili izdvojenih antigenih komponenti. U razvoju i proizvodnji cjepiva koriste se biološki materijali životinjskog ili ljudskog podrijetla, kao što su kulture stanica koji se koriste za proizvodnju antigena ili fetalni teleći serum koji se koristi za uzgoj kultura stanica. Onečišćenje se može dogoditi u različitim koracima postupka proizvodnje, uključujući polazni materijal (matične i radne banke stanica), sam postupak

proizvodnje antigena i postupak oblikovanja gotovog proizvoda. Kako bi prilikom proizvodnje i kontrole kvalitete u proizvodnji virusnih cjepiva/bioloških lijekova osigurali odsutnost stranih agensa znanstveno regulatorne smjernice propisuju *in vivo* i *in vitro* testove na prisutnost stranih agensa (virusa). Uzimajući u obzir unaprjeđenje postojećih i razvoj novih metodologija za detekciju virusa, proširuju se i spoznaje o „novim“ potencijalnim stranim agensima-virusima u cjepivima što zahtjeva usklađivanje postojećih zahtjeva koji se odnose na virusnu čistoću u svrhu osiguravanja kvalitete i sigurnosti cjepiva. Osnova samog zahtjeva za virusnu čistoću cjepiva jest ta da se nastoje popisati svi strani agensi-virusi koji bi se morali testirati te opisati testove (metode) kojima bi se popisani agensi mogli detektirati.

ZAKLJUČAK

U Republici Hrvatskoj sva cjepiva u prometu su odobrena nacionolanim postupkom, međusobnog priznavanja/decentraliziranim postupkom i centraliziranim postupkom davanja odobrenja. Regulatorni zahtjevi koji su propisani s ciljem osiguravanja cjepiva od onečišćenja stranim agensima-virusima nalaze se u smjernicama regulatornih tijela kao što su EMA, i FDA te organizacije kao što je Svjetska zdravstvena organizacija i smjernicama Međunarodne konferencije o harmonizaciji te u Europskoj i Američkoj farmakopeji. Konvencionalne metode ispitivanja u uvjetima *in vitro* i *in vivo* uključuju *in vitro* testove na staničnim kulturama i *in vivo* testove na okoćenim miševima, odraslim miševima, zamorcima, kunićima i pilećim embrijima. Prednost nad konvencionalnim pristupom detekcije stranih agensa-virusa imaju molekularno-biološke metode, temeljene na PCR-u koje su osjetljivije i brže, a k tome treba pridodati razvoj bioanalitičkih metoda temeljenih na masenoj spektrometriji koje u kombinaciji s PCR-om pokazuju visoku osjetljivost, široki spektar, točnost, veću brzinu kao i mogućnosti automatizacije procesa.

S U M M A R Y

OBJECTIVES

The objective of this paper is to give general description of the characteristics of the vaccine with emphasis on the production of viral vaccines. The aim of this thesis is also to review the regulatory requirements related to viral safety and extraneous agents testing of vaccines which significantly determines vaccines quality and safety. This thesis will describe and compare the conventional and novel methods for extraneous agents testing of vaccines.

MATERIAL AND METHODS

The method of research of these theoretical paper was based on the search of literature that was conducted electronically, by searching the bibliographic database (PubMed) and the full text database (Science Direct). The literature was searched by the research topic, research subject, authors and journal. The literature was researched from the general articles to the specialised articles. Using available online databases of the Agency for Medicinal Products and Drugs (HALMED), the European Medicines Agency (EMA), the American Food and Drug Administration (FDA), the World Health Organization (WHO), the International Conference on Harmonization (ICH) has had provided a review of guidelines and regulations wick are related to viral safety and extraneous agents testing of vaccine.

RESULTS

Vaccines are immune medications that provides active immunization against pathogenic microbes (viruses, bacteria and parasites), and are derived from live (weakened) or dead microbes, their toxins or isolated antigenic components. Vaccine development and production are profoundly linked to the use of biological material of animal or human origin, such as cell cultures obtained from various sources and foetal calf serum used for growing the cells. The use of such biological material in vaccine developepment and production may lead to potential contaminations of the vaccine products. The contamination may happen in various steps of the manufacture procedure including the starting

materials (master and working seed viruses) and the final formulation of drug product. In order to ensure the absence of adventitious virus agents in the production of viral vaccines / biological drugs, scientifically regulative guidelines prescribe *in vivo* and *in vitro* assays for the presence of foreign agents (viruses). Considering the improvement of existing and developing new methods for the detection of viruses, knowledge on "new" potential adventitious agents (viruses) in vaccines has been expanded, which requires alignment of existing requirements related to viral purity to ensure the quality and safety of the vaccine. The basis for the requirement for viral purity of the vaccine is to try to list all the adventitious agents /viruses that need to be tested and to describe the assays (methods) for their detection.

CONCLUSION

In Republic of Croatia all vaccines are approved by national procedures, mutual recognition / decentralized procedure and the centralized procedure. Regulatory requirements prescribed for the purpose of providing vaccine against foreign viruses are contained in the guidelines of regulatory bodies such as EMA, FDA and organizations such as the World Health Organization and the guidelines of the International Conference on Harmonization and the European and American Pharmacopoeia. Conventional test methods *in vitro* and *in vivo* assays include *in vitro* tests on cell cultures and *in vivo* tests on mice, adult mice, guinea pigs, rabbits and chicken embryo cells. The advantage over the conventional approach of detection of adventitious agents-viruses have a molecular-biological methods based on PCR that proved to be more sensitively and faster, and should also be added the development of bio-analytical methods based on mass spectrometry, which in combination with PCRs show high sensitivity, broad spectrum, accuracy, higher speed and possibility of process automation.

SADRŽAJ:

1	UVOD I PREGLED PODRUČJA ISTRAŽIVANJA	1
1.1	Cjepiva	1
1.1.1	Podjela cjepiva prema vrsti antigena	14
1.1.2	Pomoćne tvari u cjepivima	17
1.1.2.1	Adjuvansi	17
1.1.2.2	Konzervansi	21
1.1.2.3	Stabilizatori	22
1.1.3	Proizvodni ostaci u cjepivima	24
1.2	Put primjene cjepiva	26
1.3	Proizvodnja virusnih cjepiva	27
1.3.1	Napredak u metodama proizvodnje djelatne tvari virusnih cjepiva	29
2	CILJ ISTRAŽIVANJA	34
3	MATERIJALI I METODE - SUSTAVNI PREGLED SAZNANJA O TEMI	35
3.1	Strani agens u cjepivu	36
3.2	Potencijalni izvori virusnih onečišćenja u proizvodnji cjepiva	37
3.3	Zakonski propisi o sigurnosti od virusnog onečišćenja u cjepivima	39
3.4	Propisane metode ispitivanja virusnih onečišćenja	44
3.4.1	<i>In vivo</i> metode ispitivanja virusnih onečišćenja	46
3.4.2	<i>In vitro</i> metode detekcije virusnih onečišćenja	49
3.4.2.1	Ispitivanje prisutnosti stranih agensa u virusnoj sjemennoj seriji i staničnim kulturama	49
3.4.2.2	Ispitivanje prisutnosti stranih agensa (virusa) transmisijom elektronskom mikroskopijom	51
3.4.2.3	Molekularno - bioanalitičke metode za detekciju virusa	53
3.4.2.3.1	Lančana reakcija polimerazom (PCR)	53
3.4.2.3.2	Metode za dokazivanje retrovirusa	57
3.4.2.3.3	Mogućnosti primjene MALDI TOF masene spektrometrije u detekciji virusa ...	59
3.5	Povijesni primjeri virusnih onečišćenja u cjepivima	64
3.6	Različitosti u propisima, monografijama i smjernicama	67
3.7	Prednosti i nedostaci metoda za određivanje stranih agensa u virusnim cjepivima	70
3.8	Mogućnosti implementacije „3RS“ protokola u određivanju virusnih onečišćenja u cjepivima	72
4	RASPRAVA	73
5	ZAKLJUČCI	77
6	LITERATURA	79
7	ŽIVOTOPIS	84

1 UVOD I PREGLED PODRUČJA ISTRAŽIVANJA

1.1 Cjepiva

Cjepiva su imunološki lijekovi za aktivnu imunizaciju protiv patogenih mikroba (virusa, bakterija i parazita), a dobivaju se od živih (oslabljenih) ili mrtvih mikroba, njihovih toksina ili izdvojenih antigenih komponenti. Primarni zadatak cjepiva je potaknuti u organizmu dugotrajnu zaštitu od određenog patogenog mikroba pri čemu najvažniju ulogu imaju B-limfociti koji proizvode antigen-specifična protutijela, zatim T-limfociti (CD8+ i CD4+), odnosno memorijske B i T stanice (1).

Cjepiva se mogu podijeliti prema uzročnicima bolesti od kojih štite odnosno prema tipu mikroorganizma koji predstavlja antigen u cjepivu (bakterije, virusi i paraziti koji su inaktivirani kemijskim ili fizičkim sredstvima) (1, 2). Tipovi cjepiva su:

- živa atenuirana cjepiva odnosno živi mikrobi koji su obradom izgubili virulenciju (patogenost) ali su zadržali imunogena svojstva:
 - živi virusi (cjepivo protiv varičela, herpes zostera, rotavirusa, influence, adenovirusa, velikih boginja, žute groznice)
 - žive bakterije (cjepivo protiv tuberkuloze (BCG) i tifusa)
- inaktivirana cjepiva sadrže:
 - umrtnjane cijele mikrobe (cjepiva protiv poliomijelitisa, hepatitisa A, influence, bjesnoće za primjenu kod ljudi, krpeljnog encefalitisa, kolere)
 - rekombinantna cjepiva dobivena genetičkim inženjeringom (cjepivo protiv hepatitisa B, humanog papiloma virusa (HPV) i influence)
 - pojedince:
 - modificirani toksini (cjepivo protiv difterije i tetanusa)
 - kapsularni polisaharidi bakterija (cjepivo protiv pneumokoka, meningokoka i vrste *Haemophilus influenzae* tip B)
 - kapsularni polisaharidi vezani na proteinske nosače (konjugirano cjepivo protiv vrste *Haemophilus influenzae* tip B ili pneumokoka)

- površinski antigeni (hemaglutinin i neuraminidaza u cjepivu protiv influence) (1-3).

Virusna i bakterijska cjepiva odobrena na području Republike Hrvatske (RH) prikazana su u tablici 1. i tablici 2.

Tablica 1. Odobrena bakterijska cjepiva na području RH.

Vrsta cjepiva	Naziv lijeka	Nositelj odobrenja	Proizvođač	Farmaceutski oblik/put primjene	Adjuvans
<u>Žive oslabljene bakterije</u>					
Cjepivo protiv tuberkuloze (BCG)	BCG vaccine ssi	Imunološki zavod d.d., Zagreb	Statens Serum Institut, Copenhagen, Danska	prašak i otapalo za suspenziju za injekciju (id.)	/
<u>Polisaharidna konjugirana cjepiva</u>					
Cjepivo protiv meningokoka polisaharidno, liofilizirano (grupe A,C)	Cjepivo protiv meningokoka grupe A i C polisaharidno, liofilizirano, 1 doza (10 doza), prašak i otapalo za suspenziju za injekciju	Imunološki zavod d.d., Zagreb	Imunološki zavod d.d., Zagreb, Republika Hrvatska	prašak i otapalo za suspenziju za injekciju (id.)	/ / /
Cjepivo protiv pneumokoka	Pneumo 23 <i>(rješenje je ukinuto 24.8.2015. iz komercijanih razloga)</i>	Sanofi Pasteur S.A., Lyon, Francuska	Sanofi Pasteur S.A., Val de Reuil, Francuska; Sanofi Pasteur S.A., Marcy L'Etoile, Francuska; Sanofi-Aventis Zrt., Budimpešta, Mađarska	otopina za injekciju u napunjenoj štrcaljki (im. ili id.)	/
Cjepivo protiv tifusa, polisaharidno	Typhim Vi	Sanofi Pasteur S.A., Lyon, Francuska	Sanofi Pasteur S.A., Val de Reuil, Francuska; Sanofi Pasteur S.A., Marcy L'Etoile, Francuska	otopina za injekciju u napunjenoj štrcaljki (im.)	/
Konjugirano cjepivo protiv difterije, tetanusa, pertusisa (nestanično,	Infanrix Hexa*	GlaxoSmithKline Biologicals s.a.,	GlaxoSmithKline Biologicals s.a.	prašak i suspenzija za suspenziju za	aluminijev fosfat

komponentno), hepatitis B (rDNA), poliomijelitisa (inaktivirano) i <i>Haemophilus influenzae</i> <i>tip b</i> (adsorbirano)		Rixensart, Belgij	Rue de l'Institut 89 B - 1330 Rixensart Belgij	injekciju (<i>im.</i>)	
	INFANRIX-IPV+Hib*	GlaxoSmithKline d.o.o., Zagreb	GlaxoSmithKline Biologicals S.A., Rixensart, Belgija	prašak i suspencija za suspenciju za injekciju (duboko <i>im.</i>)	aluminijev hidroksid, hidratizirani
	Hexacima*	Sanofi Pasteur SA, Lyon, Francuska	Sanofi Pasteur Parc Industriel d'Incarville 27100 Val-de -Reuil Francuska Sanofi Pasteur SA 1541 avenue Marcel Mérieux 69280 Marcy l'Etoile Francuska	suspencija za injekciju u napunjenoj štrcaljki (<i>im.</i>)	aluminijev hidroksid, hidratizir ani
	Hexyon*	Sanofi Pasteur Europe, Lyon, Francusk	Sanofi Pasteur Parc Industriel d'Incarville 27100 Val-de – Reuil, Francuska Sanofi Pasteur SA 1541, avenue Marcel Mérieux 69280 Marcy l'Etoile Francuska	suspencija za injekciju u napunjenoj štrcaljki (<i>im.</i>)	aluminijev hidroksid, hidratizirani

	Vaxelis*	Sanofi Pasteur MSD SNC Lyon Francuska	Merck Sharp & Dohme B.V. Waarderweg 39 2031 BN, Haarlem Nizozemska	suspenzija za injekciju u napunjenoj štrcaljki (im.)	aluminijev hidroksifosfat sulfat
Konjugirano cjepivo protiv difterije, tetanusa, pertusisa (nestanično, komponentno), poliomijelitisa (inaktivirano) i <i>hemofilusa tip b</i> , adsorbirano	Pentaxim	Sanofi Pasteur S.A., Lyon, Francuska	Sanofi Pasteur S.A., Marcy L'Etoile, Francuska; Sanofi Pasteur S.A., Val de Reuil, Francuska Sanofi-Aventis Zrt., Budimpešta, Mađarska	prašak i suspenzija za suspenziju za injekciju u napunjenoj štrcaljki (im.)	aluminijev hidroksid, hidratizirani
<u>Podjedinice, pročišćene bakterije, antigeni</u>					
Cjepivo protiv tetanusa adsorbirano	Tetavax	Sanofi Pasteur S.A., Lyon, Francuska	Sanofi Pasteur S.A., Lyon, Francuska; Sanofi-Aventis Zrt., Budimpešta, Mađarska	suspenzija za injekciju u napunjenoj štrcaljki (im. ili sc.)	/
	cjepivo protiv tetanusa, adsorbirano, Imunološki zavod, 10 doza (ili 1 doza), suspenzija za injekciju	Imunološki zavod d.d., Zagreb	munološki zavod d.d., Zagreb, Hrvatska	suspenzija za injekciju u napunjenoj štrcaljki (im. ili sc.)	/
<u>-inaktivirano</u>					
Cjepivo protiv kolere, inaktivirano	Dukoral*	Valneva Sweden AB, Stockholm Švedska	Valneva Sweden AB S-105 21 Stockholm Švedska	suspenzija i šumeće granule za oralnu suspenziju (oralno)	/
<u>Kombinirana cjepiva</u>					

Cjepivo protiv difterije, tetanusa i pertusisa (nestanično, komponentno), adsorbirano	Infanrix*	GlaxoSmithKline d.o.o., Zagreb	GlaxoSmithKline Biologicals S.A., Rixensart, Belgija	suspencija za injekciju u napunjenoj štrcaljki (<i>im.</i>)	aluminijev hidroksid, hidratizirani
Cjepivo protiv difterije, tetanusa, pertusisa (nestanično, komponentno) i poliomijelitisa (inaktivirano), adsorbirano	Tetraxim***	Sanofi Pasteur S.A., Lyon, Francuska	Sanofi Pasteur S.A., Lyon, Francuska; Sanofi-Aventis Zrt., Budimpešta, Mađarska	suspencija za injekciju u napunjenoj štrcaljki (<i>im.</i>)	aluminijev hidroksid, hidratizirani
Cjepivo protiv difterije, tetanusa	Diftavax	Sanofi Pasteur S.A., Lyon, Francuska	Sanofi Pasteur S.A., Lyon, Francuska; Sanofi-Aventis Zrt., Budimpešta, Mađarska	suspencija za injekciju u napunjenoj štrcaljki (<i>im.</i> ili duboko <i>sc.</i>)	aluminijev hidroksid
Cjepivo protiv difterije, tetanusa i poliomijelitisa (inaktivirano), adsorbirano	Dultavax	Sanofi Pasteur S.A., Lyon, Francuska	Sanofi Pasteur S.A., Marcy L'Etoile, Francuska; Sanofi Pasteur S.A., Val de Reuil, Francuska; sanofi-aventis Zrt., Budimpešta, Mađarska	suspencija za injekciju u napunjenoj štrcaljki	aluminijev hidroksid
Cjepivo protiv difterije i tetanusa sa smanjenim sadržajem antigena, adsorbirano	Cjepivo protiv difterije i tetanusa sa smanjenim sadržajem antigena, adsorbirano, Imunološki zavod, 1 doza (10 doza), suspencija za injekciju	Imunološki zavod d.d., Zagreb	Imunološki zavod d.d., Zagreb, Republika Hrvatska	suspencija za injekciju (<i>im.</i>)	aluminijev fosfat
Cjepivo protiv difterije, tetanusa i pertusisa (nestanično, komponentno), sa smanjenim sadržajem antigena, adsorbirano	Adacel***	Sanofi Pasteur S.A., Lyon, Francuska	Sanofi Pasteur S.A., Lyon, Francuska; Sanofi-Aventis Zrt., Budimpešta, Mađarska	suspencija za injekciju u napunjenoj štrcaljki (<i>im.</i>)	aluminijev fosfat

id., intradermalna primjena; *im.* intramuskularna primjena; *sc.*, supkutana primjena

Za sva bakterijska cjepiva navedena u tablici temperatura skladištenja je 2°C - 8°C.

* Lijek je odobren centraliziranim postupkom davanja odobrenja za stavljanje u promet lijeka.

** Lijek koji je odobren u RH proveden je skraćeni pojednostavljeni postupak (sRUP) kojim se lijek uključuje u proceduru postupaka međusobnog priznavanja ili decentraliziranog postupaka te mu HALMED daje novo Rješenje za davanje odobrenja.

*** Lijek je odobren MRP/DCP (međusobnog priznavanja/decentraliziranim) postupkom davanja odobrenja za stavljanje u promet lijeka.

Lijekovi bez oznake su odobreni nacionalnim postupkom davanja odobrenja za stavljanje u promet lijeka.

Tablica 2. Odobrena virusna cjepiva na području RH.

Vrsta cjepiva	Naziv lijeka	Nositelj odobrenja	Proizvođač	Farmaceutski oblik/put	Adjuvans
---------------	--------------	--------------------	------------	------------------------	----------

				primjene	
<u>Živi atenuirani virusi</u>					
Cjepivo protiv herpes zostera (živo)	Zostavax *	SANOFI PASTEUR MSD, SNC 162 avenue Jean Jaurès 69007 Lyon Francuska	Merck Sharp & Dohme B.V. Waarderweg 39 2031 BN Haarlem Nizozemska	prašak i otapalo za suspenziju za injekciju /u napunjenj štrcaljki (sc. ili im.)	/
Cjepivo protiv rotavirusa, živo	Rotarix*	GlaxoSmithKline Biologicals s.a. Rixensart, Belgija	GlaxoSmithKline Biologicals s.a. Rixensart, Belgija	Prašak i otapalo za oralnu suspenziju (peroralno)	/
	RotaTeq*	Sanofi Pasteur MSD SNC, Lyon, Francuska	Sanofi Pasteur MSD SNC, Lyon, Francuska	Oralna otopina (peroralno)	/
Cjepivo protiv influence (H5N1) (živo, atenuirano)	Pandemijsko cjepivo protiv influence H5N1 MedImmune*	MedImmune, LLC, LagelandsewegCG Nijmegen, Nizozemska	MedImmune, UK Limited, Liverpool, Ujedinjeno Kraljevstvo	sprej za nos, suspenzija (nazalna)	/
Cjepivo protiv velikih boginja (živi modificirani virus vakcinije Ankara)	Imvanex*	Bavarian Nordic A/S, Kvistgaard Danska	Bavarian Nordic A/S, Kvistgaard Danska	suspenzija za injekciju (sc.)	/
Cjepivo protiv morbila, živo	Cjepivo protiv morbila, živo, liofilizirano, Edmonston-Zagreb, HDS, 1 doza (5 doza i 10 doza) prašak i otapalo za suspenziju za injekciju	Imunološki zavod, Zagreb, Republika Hrvatska	Imunološki zavod, Zagreb, Republika Hrvatska	prašak i otapalo za suspenziju za injekciju (sc. i anterolateralno, mlađoj djeci)	/
Cjepivo protiv žute groznice, živo	Stamaril, prašak i otapalo za suspenziju za injekciju u napunjenj štrcaljki, cjepivo protiv žute groznice, živo**	Sanofi Pasteur S.A., Lyon, Francuska	Sanofi-Aventis Zrt., Budimpešta, Mađarska; Sanofi Pasteur S.A., Val de Reuil, Francuska; Sanofi Pasteur S.A., Marcy L'Etoile,	prašak i otapalo za suspenziju za injekciju (sc.)	/

			Francuska		
Cjepivo protiv rubele, živo	Cjepivo protiv rubele, živo, Imunološki zavod, 1 doza (5 doza i 10 doza), prašak i otapalo za suspenziju za injekciju	Imunološki zavod, Zagreb, Republika Hrvatska	Imunološki zavod, Zagreb, Republika Hrvatska	prašak i otapalo za suspenziju za injekciju (sc.)	/
<u>Konjugirano polisaharidno</u>					
Cjepivo protiv Hemofilusa influence tip b, konjugirano	Act-HIB 10 mikrograma/0,5 ml, prašak i otapalo za otopinu za injekciju u napunjenoj štrcaljki, cjepivo protiv Hemofilusa influence tip b, konjugirano	Sanofi Pasteur S.A., Lyon, Francuska	Sanofi Pasteur S.A., Lyon, Francuska	prašak i otapalo za otopinu za injekciju u napunjenoj štrcaljki (im. ili sc.)	/
<u>Inaktivirani virusi</u>					
Cjepivo protiv influence (fragmentirani virion, inaktivirano)	VaxigripTetra	Sanofi Pasteur S.A., Lyon, Francuska	Sanofi Pasteur S.A., Lyon, Francuska	suspenzija za injekciju u napunjenoj štrcaljki (im. ili sc.)	/
	Vaxigrip	Sanofi Pasteur S.A., Lyon, Francuska	Sanofi Pasteur, Val de Reuil, Francuska; Sanofi Pasteur, Marcy L'Etoile, Francuska; Sanofi Aventis Zrt., Budimpešta, Mađarska	suspenzija za injekciju u napunjenoj štrcaljki (im. ili sc.)	/
	Fluarix	GlaxoSmithKline d.o.o., Zagreb	GlaxoSmithKline Biologicals (Branch of SmithKlineBeecham Pharma GmbH & Co. KG), Dresden, Njemačka	suspenzija za injekciju u napunjenoj štrcaljki (im. ili sc.)	/
Cjepivo protiv influence (površinski antigeni), inaktivirano	Influvac	Mylan EPD d.o.o., Zagreb	Abbott Biologicals B.V., Olst, Nizozemska	suspenzija za injekciju u napunjenoj štrcaljki (im. ili sc.)	/
	Optaflu	Novartis Influenza Vaccines Marburg GmbH, Marburg, Njemačka	Novartis Influenza Vaccines Marburg GmbH, Marburg, Njemačka	suspenzija za injekciju u napunjenoj štrcaljki (im.)	/
Cjepivo protiv influence (površinski antigeni), inaktivirano, adjuvirano	Fluad (ukinuto rješenje iz komercijalnih razloga, lijek nije na tržištu)	Novartis Vaccines Influenza S.r.l., Siena, Italija	Imunološki zavod d.d., Zagreb, Republika Hrvatska; Novartis Vaccines & Diagnostics S.r.l., Siena, Italija	suspenzija za injekciju u napunjenoj štrcaljki (im.)	MF59C.1

Cjepivo protiv influenze (H5N1) (površinski antigen, inaktiviran, adjuvantirano)	Aflunov*	Seqirus S.r.l., Siena, Italija	Seqirus Vaccines Ltd, Liverpool UK	suspencija za injekciju u napunjenoj štrcaljki (im.)	MF59C.1
Cjepivo protiv influenze (H5N1) (fragmentirani virion, inaktivirano, adjuvantirano)	Prepandrix*	GlaxoSmithKline Biologicals S.A., Rixensart Belgija	GlaxoSmithKline Biologicals S.A., Rixensart Belgija	suspencija i emulzija za emulziju za injekciju (im.)	AS03
Cjepivo protiv bjesnoće	Rabipur**	GSK Vaccines GmbH, Marburg, Njemačka	GSK Vaccines GmbH, Marburg, Njemačka	otapalo za otopinu za injekciju, prašak za otopinu za injekciju (im.)	/
Cjepivo protiv krpeljnog encefalitisa, inaktivirano	FSME-IMMUN	Pfizer Croatia d.o.o., Zagreb	Pfizer Manufacturing Austria GmbH, Orth an der Donau, Austrija	suspencija za injekciju u napunjenoj štrcaljki (im.)	/
Cjepivo protiv poliomijelitisa, inaktivirano	Imovax Polio	Sanofi Pasteur S.A., Lyon, Francuska	Sanofi Pasteur S.A., Lyon, Francuska	suspencija za injekciju u napunjenoj štrcaljki (im. ili sc.)	/
Rekombinantna cjepiva					
Cjepivo protiv hepatitisa B (rDNK), adsorbirano (HBV)	Fendrix*	GlaxoSmithKline Biologicals s.a. Rixensart, Belgija	GlaxoSmithKline Biologicals s.a. Rixensart, Belgija	suspencija za injekciju (im.)	AS04C, koji sadrži 3-O-desacil -4'- monofosforil lipid A (MPL)
	HBVaxPro*	SANOFI PASTEUR MSD SNC, Lyon Francuska	Merck Sharp & Dohme B.V., Haarlem Nizozemska	suspencija za injekciju (im.)	aluminijev hidroksifosfat sulfat
	Engerix B	GlaxoSmithKline d.o.o., Zagreb,	GlaxoSmithKline Biologicals S.A.,	suspencija za injekciju u	/

		Republika Hrvatska	Rixensart, Belgija	napunjenoj štrcaljki (<i>im.</i> i anterolateralno, mlađoj djeci)	
Cjepivo protiv humanog papiloma virusa (HPV), rekombinantno, adsorbirano	Gardasil*	Sanofi Pasteur MSD SNC, Lyon Francuska	Merck Sharp and Dohme B.V., Haarlem Nizozemsk	suspencija za injekciju u napunjenoj štrcaljki (<i>im.</i>)	aluminijev hidroksifosfat sulfat
Kombinirana cjepiva					
Cjepivo protiv morbila i rubele, živo	Cjepivo protiv morbila i rubele, živo, Imunološki zavod, 1 doza (5 doza i 10 doza), prašak i otapalo za suspenciju za injekciju	Imunološki zavod, Zagreb	Imunološki zavod, Zagreb	prašak i otapalo za suspenciju za injekciju (<i>sc.</i> i anterolateralno, mlađoj djeci)	/
Cjepivo protiv morbila, parotitisa i rubele, živo	M-M-RVAXPRO*	Merck Sharp and Dohme, B.V., Haarlem, Nizozemska	Sanofi Pasteur MSD SNC, Lyon, Francuska	prašak i otapalo za suspenciju za injekciju (<i>sc.</i> ili <i>im.</i>)	/
	Priorix**	GlaxoSmithKline d.o.o., Zagreb	GlaxoSmithKline Biologicals S.A., Rixensart, Belgija	prašak i otapalo za otopinu za injekciju u napunjenoj štrcaljki (<i>id.</i> ili <i>im.</i>)	/
Cjepivo protiv difterije, tetanusa i poliomijelitisa (inaktivirano), adsorbirano	Dultavax	Sanofi Pasteur S.A., 2 Avenue Pont Pasteur, Lyon, Francuska	Sanofi Pasteur S.A., Marcy L'Etoile, Francuska; Sanofi Pasteur S.A., Val de Reuil, Francuska; sanofi-aventis Zrt., Budimpešta, Mađarska	suspencija za injekciju u napunjenoj štrcaljki, (<i>im.</i>)	aluminijev hidroksid
Cjepivo protiv morbila, parotitisa, rubele i varičele, živo	ProQuad*	Sanofi Pasteur MSD SNC, Lyon, Francuska	Merck Sharp and Dohme, B.V., Haarlem, Nizozemska	prašak i otapalo za suspenciju za injekciju u napunjenoj štrcaljki (<i>sc.</i>)	/
Cjepivo protiv hepatitisa A (inaktiviranog) i hepatitisa B (rDNA) (adsorbirano)	Twinrix A*	GlaxoSmithKline Biologicals s.a. Rixensart Belgija	GlaxoSmithKline Biologicals s.a. Rixensart Belgija	Suspencija za injekciju (<i>im.</i>)	aluminijev fosfat

Za virusna cjepiva navedena u tablici temperatura skladištenja je 2°C - 8°C, osim kombiniranog cjepiva ProQuad koje se mora skladištiti pri temperaturi - 50°C.

* Lijek je odobren centraliziranim postupkom davanja odobrenja za stavljanje u promet lijeka.

** Lijek koji je odobren u RH proveden je skraćeni pojednostavljeni postupak (sRUP) kojim se lijek uključuje u proceduru postupaka međusobnog priznavanja ili decentraliziranog postupaka te mu HALMED daje novo Rješenje za davanje odobrenja.

*** Lijek je odobren MRP/DCP (međusobnog priznavanja/decentraliziranim) postupkom davanja odobrenja za stavljanje u promet lijeka

Lijekovi bez oznake su odobreni nacionalnim postupkom davanja odobrenja za stavljanje u promet lijeka.

U RH za sva virusna i bakterijska cjepiva koja su u prometu i navedena su u tablici 1 i tablici 2 odobrenje za stavljanje u promet dala je Agencije za lijekove i medicinske proizvode (HALMED) ili Europska komisija (EK). Danom pristupanja RH Europskoj Uniji (EU) centralizirani postupak (CP) davanja odobrenja je postao obavezan za lijekove s djelatnom tvari namijenjenom za liječenje virusnih bolesti. Sve odluke o odobrenju za stavljanje virusnih i bakterijskih cjepiva u promet u EU dane na temelju CP postale su važeće i u RH. U CP-u stručnu znanstvenu ocjenu dokumentacije o lijeku provodi Europska agencija za lijekove (EMA), a odobrenje za stavljanje lijeka u promet daje EK te ono vrijedi za sve zemlje članice EU. U ocjenu kakvoće, djelotvornosti i sigurnosti svakog lijeka pri EMA-i uključeni su stručnjaci iz svih zemalja članica EU pa tako i RH. Cjepiva odobrena CP postupkom su navedena i u tablicama 1 i 2. Osim CP postupkom cjepiva su odobrena postupkom međusobnog priznavanja, a koji se temelji na postupku međusobnom priznavanju (engl. *mutual recognition*) i prihvaćanju stručno znanstvene ocjene jedne od zemalja članica EU, a u svrhu davanja odobrenja za lijek u svim ostalim zemljama članicama u kojima je zahtjev za davanje odobrenja podnesen (primjerice, davanje odobrenja MRP postupkom, šifra postupka DE/H/0216/002/MR, sa referentnom zemljom Njemačkom za lijek Rabipur prašak i otapalo za otopinu za injekciju u napunjenoj štrcaljki). Odobrenje dano decentraliziranim postupkom koji istovremeno započinje u referentnoj i u drugim državama članicama EU koje sudjeluju u postupku u kojem referentna država članica prvi put ocjenjuje dokumentaciju o lijeku uz aktivno sudjelovanje svih država koje su u postupku (primjerice, davanje odobrenja DCP postupkom, šifra postupka DE/H/1949/001/DC, sa referentnom zemljom Njemačkom za lijek Vaxigrip Tetra suspenzija za injekciju u napunjenoj štrcaljki, četverovalentno cjepivo (fragmentirani virion, inaktivirano)). Uz zahtjev za davanje odobrenja za sva cjepiva podnositelj zahtjeva obavezan je priložiti dokumentaciju o lijeku koja se dostavlja u obliku Zajedničkog tehničkog dokumenta (engl. *Common Technical Document*, CTD) sukladno zakonskoj

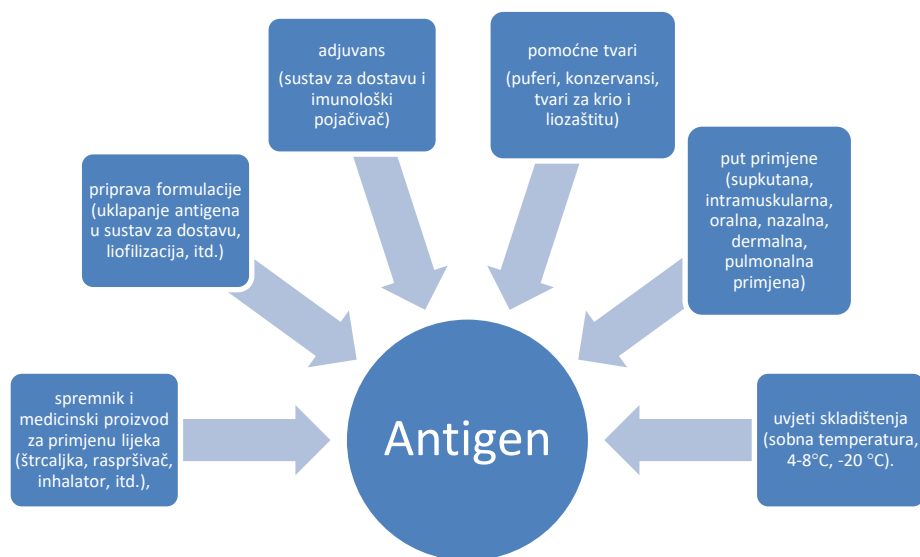
osnovi prema članku 26. Zakona o lijekovima („Narodne novine“, broj 76/13.) i članku 8. Pravilnika o davanju odobrenja za stavljanje lijeka u promet („Narodne novine“, broj 83/13.) (4, 5).

Pozitivan utjecaj cijepljenja na poboljšanje javnog zdravlja je dobro poznat (3). Primjerice o tome svjedoči podatak da je nakon uvođenja cjepiva protiv velikih boginja bolest iskorijenjena 1977. u odnosu na 1950. godinu kada je bilo zabilježno oko 50 milijuna oboljelih. U novije vrijeme provođenjem cijepljenja djece na globalnoj razini u prioritetnim zemljama (*zemljama u razvoju, kao što su npr. države Afrike, Indija i td.*), od 2000. godine do 2008. zabilježeno je smanjenje smrtnosti u djetinjstvu sa 700.000 na 164.000 slučajeva uzrokovanih virusom morbila (6). U većini zemalja provode se nacionalni programi cijepljenja što je rezultiralo značajnim smanjenjem morbiditeta i mortaliteta u djetinjstvu. Primjerice u RH od 1961. godine obavezno je cijepljenje protiv poliovirusa s oralnim, atenuiranim poliovirusnim cjepivom (OPV), koje je 2008. godine zamijenjeno sa inaktiviranim cjepivom (IPV) te je posljedično 21. lipnja 2002. godine proglašena eradikacija poliomijelitisa u Hrvatskoj istodobno s proglašenjem eradikacije poliomijelitisa u europskoj regiji (7). Međutim, još uvijek postoje zarazne bolesti za koje ne postoji učinkovito cjepivo, kao primjerice AIDS i malarija. (6). Također, pojava novih zaraznih bolesti koje prijete javnom zdravlju (primjerice bolesti uzrokovane pandemijskim virusom influence A (H1N1) ili Zika virusom) naglašava važnost brzog procesa od identifikacije imunogena na kojem će se temeljiti cjepivo do razvoja stabilnog, komercijalno dostupnog cjepiva (3).

Razvoj formulacije cjepiva

S ciljem razvoja učinkovitog i sigurnog cjepiva osim odabira antigena potrebno je pravilno odabrati i druge komponentne koje čine gotovi imunološki lijek što je shematski prikazano Slikom 1. Ovisno o imunogenosti antigena i odabranog puta primjene, ako je primjenjivo, potrebno je odabrati odgovarajuće pomoćno sredstvo – adjuvans koji ima ulogu sustava za dostavu antigena (terapijskog sustava) i/ili ulogu „imunološkog pojačivača“. Adjuvansi određuju jačinu i kvalitetu imunskog odgovora te aktiviraju stanice koje prikazuju antigene (engl. *antigen presenting cells*, APC) (6). Pomoćne tvari, kao što su puferi, konzervansi i stabilizatori, ključni su za uspješnu pripravu lijeka te

mu određuju rok valjanosti. Rok valjanosti usko je povezan s konačnim oblikom (tekući ili suhi oblik), a važnu ulogu ima i primarna ambalaža.



Slika 1. Ključne komponente koje treba uzeti u obzir prilikom razvoja cjepiva (preuzeto iz (6)).

Za razvoj formulacije, uz karakterizaciju stabilnosti antigena s obzirom na njihova fizičko-kemijska svojstva i skladnim odabirom pomoćnih tvari, potrebno je provesti opsežna ispitivanja stabilnosti pod određenim uvjetima kojima su komponente izložene tijekom proizvodnje (pH, temperatura, ionska jakost, smrzavanje/odmrzavanje) te pri stvarnim uvjetima skladištenja i distribucije do preporučenog roka valjanosti uz određenu temperaturu skladištenja (3). Opsežna ispitivanja stabilnosti formulacije kojih se proizvođač treba pridržavati propisuje smjernica Svjetske zdravstvene organizacije (SZO) naziva „*Guideline on stability evaluation of vaccines*“ koja u prvom dijelu razmatra općenitu evaluaciju stabilnosti cjepiva, stabilnost cjepiva tijekom proizvodnog procesa i njegovoj daljnjoj uporabi s naglaskom na međuprodukte i gotovi lijek (8).

Iz priloženih Tablica 1 i 2 vidljivo je da živa cjepiva ne sadrže adjuvanse. Živa cjepiva su osjetljivija na više temperature tijekom skladištenja i distribucije u smislu mogućeg gubitka potentnosti cjepiva. Kako bi se osigurala što bolja stabilnost živih cjepiva tijekom skladištenja i distribucije, gotovi proizvod se pripravlja u suhom obliku najčešće sušenjem smrzavanjem (liofilizacijom). Temperatura

skladištenja liofiliziranih cjepiva je od 2°C - 8°C, a rok valjanosti nekoliko mjeseci do par godina. Za uspješnu pripravu suhog oblika ključan je dodatak tvari za krio- i liozaštitu. Liofilizirana cjepiva prije primjene se rekonstituiraju pomoću odgovarajućeg otapala. Kao otapalo najčešće se koristi sterilna voda koja u sebi može sadržavati i stabilizatore. Liofilizirano cjepivo nakon rekonstitucije primjenjuje se unutar nekoliko sati, ali samo uz određene uvjete čuvanja (zaštita od svjetla, niska temperatura). Za razliku od živih cjepiva, cjepiva kao što su inaktivirana virusna i bakterijska cjepiva, cjepiva od pročišćenih podjedinica proteina i polisaharidnih antigena te cjepiva od rekombinantnih podjedinica proteinskih antigena često sadrže adjuvanse. Nadalje, adjuvirani antigeni su stabilniji te cjepiva dolaze na tržište najčešće kao tekući pripravci. Skladište se pri 2 °C - 8°C, a osjetljiva su na niske temperature; smrzavanje može izazvati gubitak potentnosti cjepiva (3).

Odabranim putem primjene cjepiva najčešće se pokušava oponašati prirodni put zaraze pa se tako neka živa, oslabljena cjepiva primjenjuju oralno (cjepivo protiv poliomijelitisa, cjepivo protiv kolere i cjepivo protiv rotavirusa) ili nazalno (cjepivo protiv influence), ali se još uvijek puno živih cjepiva primjenjuje parenteralno (*im.* ili *sc.*), a pružaju zaštitu protiv patogena koji se prenose drugim putem (npr. fekalno-oralno) (3).

1.1.1 Podjela cjepiva prema vrsti antigena

Antigeni se mogu koristiti u svom izvornom obliku, živi virusi ili bakterije koje se detoksificiraju ili na drugi način modificiraju kemijskim ili fizičkim sredstvima. Antigeni koji su inaktivirani mogu biti agregirani, polimerizirani i konjugirani na nosač/adjuvans kako bi im se povećala imunogenost (9).

Živa atenuirana virusna i bakterijska cjepiva

Živa atenuirana virusna cjepiva sastoje se od infektivnih virusnih čestica koje se mogu umnažati u ciljnom organizmu (3). Dobivaju se produljenom pasažom virusa divljeg tipa u staničnoj kulturi pri različitim uvjetima (temperaturi, različitim staničnim linijama i/ili u prisutnosti mutagena). Atenuirani virusi imunološki su slični divljem tipu virusa, zadržavaju sposobnost replikacije, ali značajno su manje izražene patogenosti. Uz infektivne virusne čestice, u formulaciji su obično u suvišku prisutne inaktivne virusne čestice. Živi atenuirani virusi sa ovojnicom su cjepiva protiv varičele, parotitisa, morbila (10). Ti antigeni su relativno nestabilni i zahtijevaju složene formulacije i konačan suhi oblik kako bi se postigao odgovarajući rok valjanosti. Živi atenuirani virusi bez ovojnice kao što su poliovirus i rotavirus su stabilniji u tekućem obliku. Za žive atenuirane viruse karakteristična je veća mogućnost izazivanja patogenosti u usporedbi s ostalim cjepivima (3).

Živom atenuiranom bakterijskom cjepivu (primjerice Cjepivo protiv tuberkuloze (BCG)) antigen je atenuirani, ali živi soj bakterije (primjerice soj bakterije *Mycobacterium bovis*) koji je dobiven (najčešće trećom pasažom) iz originalnog soja (*BCG, lofilizata*) i čuva se u SZO-i u svom izvornom obliku. Uzgoj bacila je na tekućoj Sauton podlozi na kojoj rastu u obliku peteljke te nakon filtracije i prešanja, polusuha mikrobakterijska masa se homogenizira pri određenoj temperaturi, nakon čega se liofilizira (11).

Inaktivirani virusi i bakterije

Virusi ili bakterije obično su inaktivirani pomoću reagensa kao što je formaldehid. Umrtvljeni tj. inaktivirani antigeni su manje imunogeni od živih antigena te im se dodaju adjuvansi s ciljem povećanja njihove učinkovitosti te kako bi se spriječile moguće konformacijske promjene koje dovode

do smanjenja potentnosti antigena. Prednost inaktiviranih cjepiva uključuje vrlo malu mogućnost pojave patogenosti te poboljšanu stabilnost u usporedbi sa živim atenuiranim cjepivima. Obično su tekućeg oblika u staklenim bočicama i/ili štrcaljkama. Uspješni primjeri inaktiviranih virusnih cjepiva su cjepiva protiv influence, hepatitisa A i poliomijelitisa (3).

Rekombinantna virusna cjepiva

Primjena tehnologije rekombinantne DNA (rDNA) omogućila je razvoj cjepiva koja se temelje na pojedinačnim komponentama virusa i bakterija. U slučaju virusnih cjepiva, klonirani su i izolirani površinski proteini (primjerice cjepivo protiv hepatitisa B), a koji se mogu spontano organizirati u multiproteinske komplekse slične virusima bez genskog materijala (engl. *virus-like particles*, VLP; primjerice cjepivo protiv HPV-a). Monomerni rekombinantni virusni proteinski antigeni su vrlo često slabo imunogeni te za razvoj učinkovitog cjepiva potreban je dodatak potentnih adjuvansa. Prednost VLP čestica je prisustvo više epitopa iz čega proizlazi bolja simulacija prirodnih antigena te veća učinkovitost cjepiva u usporedbi s monomernim rekombinantnim antigenima (3, 12). Osim VLP čestica proizvode se i molekularni kompleksi, pod nazivom virosomi koji su građeni od viralnih membrana rekonstituiranih s viralnim lipidima i proteinima (13, 14). Primjeri takvih cjepiva su cjepiva protiv virusa hepatitisa A (Epaxal®; Crucell Spain, SA, Madrid, Španjolska) i virusa influence (Inflexal® V; Crucell 44 Spain SA), koja su odobrena u EU, ali nisu odobrena u RH (13). Primjerice proizvodnja virosoma uključuje solubilizaciju virusa influence površinski aktivnim tvarima i posljedično rekonstituciju viralnih membrana s dva glikoproteina iz omotača virusa influence, hemaglutininom i neuraminidazom.

Polisaharidna cjepiva

Antigeni polisaharidnih cjepiva su pročišćeni kapsulirani polisaharidi. Primjeri takvih cjepiva sada su široko dostupni, a to su cjepiva protiv bakterija *Haemophilus influenzae* (15) i *Streptococcus pneumoniae* (3). Pneumokokno polisaharidno cjepivo se koristi u prevenciji pneumonija odraslih, a dobivena su od većeg broja bakterijskih polisaharidnih serotipa. Primjeri su Pneumo 23 i Penumovax koji sadže 25 µg od svakog od 23 polisaharidna serotipa koja su odgovorna za većinu bakterijemičnih

pneumokoknih bolesti (3). Osim navedenih dostupna su i konjugirana polisaharidna cjepiva koja sadže pročišćene polisaharidne antigene koji su konjugirani na proteinski nosač (netoksični mutant difterijskog toksoida, pod nazivom CRM 197). Konjugirana su kako bi se antigenu pojačala imunogenost (3).

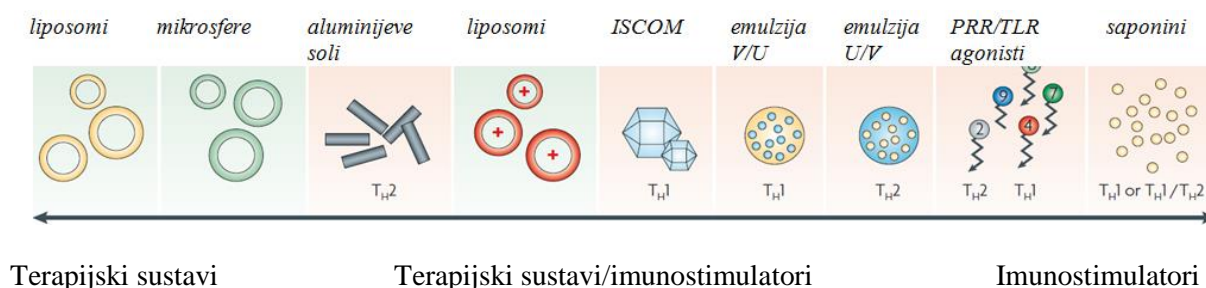
1.1.2 Pomoćne tvari u cjepivima

S obzirom na osjetljivost antigena u cjepivu, posebna pažnja je usmjerena na odabir pomoćnih tvari s ciljem razvoja formulacije cjepiva odgovarajuće potentnosti, stabilnosti i učinkovitosti (6).

1.1.2.1 Adjuvansi

Adjuvans se definira prema svojoj ulozi u cjepivima. Adjuvans (lat. *adjuvare*, pomoći) je komponenta koja pojačava imunogenost antigena, izaziva brži imunosni odgovor (povećava titar protutijela), smanjuje količinu potrebnog antigena u cjepivu, povećava širinu imunosnog odgovora na više različitih patogena, izaziva snažniji i dugotrajniji imunosni odgovor te prevladava slabiji imunosni odgovor na cijepljenje kod pedijatrijske i starije populacije (16, 17).

Iako su adjuvansi u kliničkoj uporabi gotovo 90 godina i ogromna količina truda je uložena u njihov razvoj, još uvijek je popis klinički odobrenih adjuvansa vrlo kratak (6). Adjuvansi koji se koriste u virusnim cjepivima (osim u slučaju živih atenuiranih virusnih cjepiva) su aluminijske soli (aluminijev hidroksid, aluminijev hidroksifosfat sulfat i aluminijev fosfat), MF59.1, liposomi, ASO3 (U/V emulzija s α -tokoferolom) i ASO4 (Tablica 2). Najčešća je podjela adjuvansa u prvu i drugu generaciju. Prvoj generaciji adjuvansa pripadaju netopljive aluminijske soli (18, 19) i emulzije (20). Drugoj generaciji pripadaju primjerice liposomi i mikročestice (21).



Slika 2. Podjela adjuvansa prema njihovoj ulozi/mehanizmu djelovanja (preuzeto iz (16)).

Adjuvansi koji su imunostimulatori ubrzavaju, pojačavaju ili produljuju imunološku reakciju na specifični antigen. Dodaju se antigenima slabe imunogenosti kao što su inaktivirani virusi i bakterije,

rekombinanti virusi i polisaharidi (16, 17). Aktiviraju adaptivni (stečeni) imunski odgovor (humoralni i/ili stanično posredovani) koji je posredovan urođenim imunskim odgovorom. Stanična imunost, odnosno tip imunskog odgovora T_H1 , karakteriziran je sa uništavanjem stanica na čijoj se površini nalaze peptidi patogena koji su prezentirani preko MHC molekula tipa I, a djelovanjem T stanica. Humoralna imunost, tip imunske reakcije T_H2 , aktivira proizvodnju B stanica koje luče antigen-specifična protutijela. Mehanizam djelovanja adjuvansa još uvijek nije u potpunosti poznat (16, 17). Međutim, poznato je da su neki adjuvansi učinkoviti u induciranju humoralnog imunskog odgovora, drugi adjuvansi stimuliraju stanično posredovanu imunost te postoje adjuvansi koji stimuliraju i humoralni i stanično posredovani imunski odgovor na antigen cjepiva (16, 17).

Adjuvansi koji su terapijski sustavi odnosno nosači antigena stabiliziraju antigen, zadržavaju ga na mjestu primjene (na mjestu primjene nastaje depo iz kojega se antigen produljeno i kontrolirano oslobađa i time produljuje i njegovo djelovanje) i/ili dostavljaju ga do određenih organa (limfnih čvorova) i imunokompetentnih stanica (17).

Aluminijeve soli kao adjuvansi

Najčešće korišteni adjuvansi u cjepivima za primjenu u ljudi su slabo topljive soli aluminija (aluminijev fosfat, aluminijev hidroksid, kalijev aluminijevog sulfat ili mješane aluminijeve soli) i trenutno se upotrebljavaju u cjepivima protiv difterije, tetanusa, pertusisa, hepatitisa B, antraksa, hemofilusa i humanog papiloma virusa (3). Adjuvantski učinak aluminijevih soli rezultat je prvenstveno adsorpcije antigena na čestice aluminijevih soli. Antigeni se adsorbiraju na površinu aluminijevih adjuvansa različitim mehanizmima, razmjenom liganada, elektrostatski, hidrofobnim silama ili Van der Waalsovima silama (22). Jedan od ključnih načina djelovanja adjuvansa aluminijevih soli je da na mjestu primjene stvaraju depo iz kojeg se postupno i kontrolirano oslobađaju adsorbirani antigeni kako bi inducirali što jaču i dugotrajniju imunološku reakciju. Na mjesto primjene dolazi do pojave lokalnih upalnih procesa te dolazi do aktiviranja faktora regrutacije čiji su medijatori citokini (kemokini) koji posreduju ili reguliraju imunski odgovore te nadziru sve funkcije urođenog i stečenog imuniteta. Poznato je da adjuvansi aluminijevih soli stimuliraju humoralni imunski odgovor (22).

Emulzijski adjuvansi

Nakon aluminijevih soli, najzastupljeniji adjuvasni u cjepivima su emulzije (16). Emulzije se definiraju kao disperzni sustavi koji se sastoje od dviju tekućina koje se međusobno ne miješaju ili se jedna s drugom miješa samo ograničeno. Razdijeljena tekućina čini unutarnju ili disperznu fazu, a nerazdijeljena tekućina vanjsku ili kontinuiranu fazu. Jedna tekućina je lipofilna (npr. biljno ili mineralno ulje, trigliceridi i sl.), a druga hidrofilna (npr. voda ili vodena otopina) pa se emulzije dijele na emulzije tipa ulje u vodi (U/V), kada je vanjska faza vodena, ili voda u ulju (V/U), kada je vanjska faza uljna. Neophodna je upotreba emulgatora kako bi se olakšala izrada i postigla stabilnost disperzija dviju tekućina koje se ne miješaju (16). Antigen je obično smješten u vodenoj fazi, dok neki amfifilni antigeni mogu biti smješteni na međupovršini (16).

Adjuvantni učinak emulzije V/U isti je kao i već opisani adjuvantni učinak aluminijevih soli. U/V emulzije s antigenom nakon što se primjene u mišić (tkivo koje ne sadrži imunosne stanice) izazivaju upalnu reakciju i aktivaciju faktora regrutacije (citokini ili kemokini) koji privlače imunokompetentne stanice na mjesto primjene koje preuzimaju antigen te ih vode do limfnih čvorova. V/U emulzije induciraju stanično posredovani imunosni odgovor, tip T_H1 , za razliku od U/V emulzija koji stimuliraju humoralni imunitet (17).

1997. godine odobreno je cjepivo za primjenu u ljudi u kojemu je MF59 emulzija imala ulogu adjuvansa te koja se sastoji od biorazgradivog i biokompatibilnog ulja, skvalena (17, 23). Skvalen je uljna komponenta koja se koristi u pripravi nekoliko U/V emulzija adjuvansa, primjeri su virusna cjepiva, Fluad® (cjepivo protiv influence (površinski antigeni), inaktivirano, adjuvantirano s MF59C.1), Aflunov® (prepandemijsko cjepivo protiv influence (H5N1) (površinski antigen, inaktivirano, adjuvantirano)), Prepandrix® (prepandemijsko cjepivo protiv influence (H5N1) (fragmentirani virion, inaktivirano, adjuvantirano sa ASO3)) (17, 24). Sigurnost primjene MF59 je procijenjena u velikom broju ispitanika različitih dobnih skupina, a sigurnost primjene potvrđena je i u djece u dobi od 6 mjeseci (23). Alternativni emulzijski adjuvansi, ASO3 (proizvođača GSK) i AFO3 (proizvođača Sanofi), prvi put su odobreni tijekom pandemije H1N1 influence u 2009. godini (25).

Liposomi

Liposomi su koloidne vezikule građene od jednog ili više koncentričnih dvosloja fosfolipida koji okružuju vodeni mediji. Prednost liposoma je biokompatibilnost i biorazgradljivost. Razlog tom jest da su građeni od istih građevnih jedinica, fosfatidilkolina i kolesterola, kao i stanične membrane. U lipidni dvosloj mogu se uklapati lipofilne molekule, a u vodeni odjeljak hidrofilne molekule. Zbog navedenog svojstva, liposomske formulacije mogu smjestiti različite vrste antigena (uključujući peptide, proteine, ugljikohidrate, nukleinske kiseline i haptene) (26). Odabirom lipidnih sastojaka mogu se postići različita fizičko-kemijska svojstva liposoma što određuje njihov imunopotencirajući učinak (27). U prekliničkim ispitivanjima, dokazano je da fizičko-kemijska svojstva kao što su naboj, veličina čestica, fluidnost fosfolipidne membrane, temperatura staklastog prijelaza membrane, položaj uklopljenog antigena utječu na potenciju liposoma kao adjuvansa (26).

Antigeni se mogu vezati na površinu liposoma, kovalentnim ili nekovalentnim vezama, mogu biti smješteni u vodeni dio, adsorbirani na površinu ili uklopljeni u membranu lipida.

Liposomi se dugi niz godina koriste kao terapijski sustavi te je na području EU odobren veći broj lijekova koji se temelje na tehnologiji liposoma. U posljednjih 15 godina razvila se tehnologija proizvodnje cjepiva za ljudsku primjenu sa liposomskim adjuvansima te je danas odobreno nekoliko cjepiva koja sadrže liposome kao adjuvans, a određen broj je u različitim fazama kliničkih ispitivanja (26). Liposomi koji se koriste kao terapijski sustavi i na površini imaju vezani virusni protein ili lipid su virosomi koji ne sadrže genetičku informaciju virusa i nemaju sposobnost repliciranja i izazivanja infekcije. Odobrena cjepiva koja koriste virosome/liposome kao terapijske sustave jesu cjepivo protiv virusa hepatitisa A (Epaxal®) i cjepivo protiv virusa influence (Inflexal®) (26).

Polimerne mikro/nanočestice

S obzirom da su cjepiva sa aluminijevim solima kao adjuvansima djelotvorna u pobuđivanju humoralne reakcije (titra protutijela), ali ne induciraju snažni stanični odgovor, odnosno proizvodnju T stanica, istražuju se nove vrste potencijalnih adjuvansa (28, 29).

Kao potencijalni adjuvansi dulji niz godina istražuju se već polimerne mikro- i nanočestice. Najčešće korišteni polimer je kopolimer mliječne i glikolne kiseline (engl. *poly(lactic-co-glycolic acid)*, PLGA)

zbog biorazgradljivosti i biokompatibilnosti (29) odnosno sigurnosti primjene koja je dokazana dugogodišnjom kliničkom primjenom lijekova temeljenih na tehnologiji PLGA mikročestica. Osim za intramuskularnu i supkutanu primjenu, PLGA čestice istražuju se i za alternativne putove primjerice oralnu primjenu cjepiva. Mikro i nanočestice imaju ulogu nosača antigena te se antigeni uklapaju u polimerni matriks ili se adsorbiraju na površinu čestica (30, 31).

ISCOM adjuvansi

Imunostimulacijski kompleksi (engl. *Immune stimulating complexes*, ISCOM) su koloidni sustavi koje čine antigen, kolesterol, fosfolipidi i saponini. ISCOMATRIX je adjuvans koji se sastoji od kolesterola, fosfolipida i saponina (Quil A). ISCOMATRIX cjepivo je formulacija antigena i adjuvansa ISCOMATRIX. ISCOM i ISOMATRIX cjepiva su više imunogeni kao nosači antigena od ostalih terapijskih sustava. Važnu ulogu u navedenim cjepivima, kao ugrađeni dio adjuvansa ima Quil A. Povećava stabilnost cjepiva, smanjuje hemolitičku djelovanje i toksičnost. Mnoge kliničke studije dokazuju da ISCOM i ISCOMATRIX cjepiva induciraju snažni stanično-posredovani imunološki odgovor i/ili humoralni imunološki odgovor na široki spektar različitih antigena, kao što su virusi, bakterije, paraziti ili stanice tumora. Navedena cjepiva za primjenu u ljudi su trenutno u kliničkoj fazi ispitivanja (32).

1.1.2.2 Konzervansi

Konzervansi se koriste kako bi spriječili mikrobiološko kvarenje cjepiva, a pacijente od moguće infekcije. Koriste se u formulacijama koje se pakiraju u višedozne spremnike. Njihova uporaba se procjenjuje uzimajući u obzir vjerojatnost onečišćenja cjepiva tijekom korištenja višedoznog spremnika u maksimalno preporučenom periodu za uporabu (1).

Konzervansi koji su odobreni i koriste se u cjepivima su fenol, 2-fenoksietanol i tiomersal (33). Najčešće korišteni konzervans je tiomersal, koji sadži male količine organske žive, a upotrebljava se za sprječavanje rasta bakterija i gljivica u inaktiviranim cjepivima. Također se koristi i u proizvodnji nekih cjepiva, osobito radi inaktivacije određenih organizama i toksina. Tiomersal se koristi u

proizvodnji od 1930. godine. Prema SZO 2011.godine cjepiva koja sadrže tiomersal su cjepivo protiv difterije, tetanusa i pertusisa (DTP), hepatitisa B, *H. influenzae* tip b (Hib), bjesnoće, influence i meningokoka (6).

Kao što je već spomenuto uz tiomersal odobrena su još dva konzervansa, 2-fenoksietanol koji je sadržan u cjepivu protiv poliomijelitisa i fenol koji je sadržan u cjepivu protiv tifusa. Dodatak konzervansa u formulaciju može utjecati na učinkovitost i sigurnost primjene cjepiva te je stoga potreban dugotrajniji i zahtjevniji razvojni proces cjepiva (6).

Kasnih 1990.-ih godina pojavila se teorijska zabrinutost o sigurnoj primjeni tiomersala na osnovi izračuna da je ukupna količina žive unesena cijepljenjem u dojenčadi potencijalno premašila preporučeno dozvoljenu koncentraciju od strane Američke agencije za lijekove i hranu (engl. *Food and drug Administration*, FDA). Međutim, tiomersal, sadrži etil živu, a ne metil živu. Etil živa se raspada mnogo brže nego metil živa i ne akumulira se u tijelu. Takva sigurnosna pitanja vezana uz upotrebu tiomersala u cjepivima dovele su do inicijative u nekim zemljama da se tiomersal eliminira, smanji njegova količina ili zamjeni drugim konzervansom u cjepivima višedozne primjene (6).

SZO pomoću svoje neovisne stručne savjetodavne skupine za sigurnost cjepiva (engl. *Global Advisory Committee on Vaccine Safety*) zadnjih 10 godina prati znanstvene dokaze koji se odnose na korištenje tiomersala kao konzervansa u cjepivu i sredstva za inaktivaciju antigena te je zaključak da ne postoje dokazi koji ukazuju da količina tiomersala koja se koristi u cjepivima predstavlja zdravstveni rizik (6).

1.1.2.3 Stabilizatori

Stabilizatori su pomoćne tvari kojima je uloga stabilizirati antigen tijekom pripreme konačnog oblika te tijekom skladištenja. Posebno je važna njihova uloga u zaštiti antigena pri postupcima smrzavanja i liofilizacije, a ti stabilizatori nazivaju se kriozaštitna i liozaštitna sredstva. Stabilizatori također sprječavaju adsorpciju antigena na stjenke spremnika (33). Stabilizatori koji se najčešće koriste u cjepivima su šećeri (npr. saharoza, laktoza), aminokiseline (npr. glicin, histidin, arginin, mononatrijev glutamat) i proteini (npr. želatina ili humani serumski albumin (HSA)) (33). Aminokiseline se također koriste kao puferi, sredstva za izotonizaciju i antioksidansi (34, 35)

HSA te želatina životinjskog podrijetla koriste se kao stabilizatori u živim virusnim cjepivima (36). Proizvodnja HSA se temelji na frakcioniranju ljudske plazme, što je povezano sa potencijalnim rizikom od zaraze patogenima iz krvi donora ljudske plazme. Danas se proizvodnja HSA temelji na tehnologiji rDNA (36). HSA (0.3 mg/dozi) se primjerice nalazi u cjepivima protiv varičele (Varivax, proizvođač Merck), protiv morbila, parotitisa i rubele (M-M-RVAXPRO, proizvođača MSD i Priorix, proizvođača GSK) (33).

1.1.3 Proizvodni ostaci u cjepivima

Proizvodni ostaci kao što su sredstva za inaktivaciju (primjerice formaldehid), antibiotici i stanični ostaci mogu se pronaći u gotovom proizvodu (33).

Sredstva za inaktivaciju

Najčešće korišteno sredstvo za inaktivaciju je formaldehid koji se koristi za inaktivaciju virusa influence, polio virusa, toksikoida difterije i tetanusa, zatim beta-propiolakton koji se koristi za inaktivaciju virusa bjesnoće te glutaraldehid koji se koristi za inaktivaciju toksina sadržanih u nestaničnim cjepivima protiv pertusisa (33).

Iako visoke koncentracije formaldehida mogu imati štetni učinak na DNA stanice te mogu uzrokovati kancerogene promjene *in vitro* (33, 37) dokazano je da u visokim dozama od 25 mg/kg pri jednokratnoj primjeni i 80-100 mg/kg/dan pri dugotrajnoj primjeni kod životinja ne uzrokuju maligne promjene stanica (33, 38). Također nema podataka koji pokazuju da uzrokuje karcinom u ljudi (39).

Unos formaldehida cjepivom u organizam smatra se sigurnim s obzirom da je formaldehid esencijalan intermedijer u metabolizmu te je potreban za sintezu tiamida, purina i drugih aminokiselina te količina formaldehida u cirkulaciji čovjeka iznosi oko 2,5 µg/mL krvi (40). Prema Europskoj Farmakopeji (Ph. Eur.) najveća dopuštena koncentracija formaldehida u gotovoj masi cjepiva je 0,2 g/l (9).

Antibiotici

Antibiotici su prisutni u nekim cjepivima za sprječavanje bakterijskog onečišćenja tijekom proizvodnog postupka. Budući da antibiotici mogu uzrokovati trenutne reakcije preosjetljivosti u djece antibiotici kao što su penicilini, cefalosporini te sulfonamidi ne koriste se pri proizvodnji cjepiva (33, 41). Antibiotici koji se koriste u proizvodnji cjepiva uključuju neomicin, streptomycin, polimiksin B, klortetraciklin i amfotericin B. Od svih navedenih, jedino je neomicin sadržan u cjepivima u tako malim koncentracijama da nisu zabilježene reakcije preosjetljivosti neposrednog tipa (42).

Stanični ostaci

➤ Proteini jaja

Proteine jaja moguće je pronaći u nekim cjepivima s obzirom da se neka virusna cjepiva dobivaju propagiranjem u alantionskoj šupljini embrioniranih kokošjih jaja bez specifičnih patogena ili u primarnoj kulturi pilećih fibroblasta (33). Proteini iz jaja nalaze se u cjepivima protiv influence (približno 0,02-1,0 µg/dozi) te mogu izazvati alergiju kod djece koja su alergična na jaja (33, 43). MMR cjepiva protiv influence, morbila i parotitisa također sadrže proteine jaja ali u vrlo maloj količini (oko 40 pg), koja nije dovoljna za poticanje alergijske reakcije te se smatra sigurnim za primjenu i u djece s teškim alergijama na jaja (44).

➤ Proteini kvasca

Malene količina proteina kvasca se mogu naći u cjepivima čiji antigeni se proizvode propagacijom na stanicama kvasca (*Saccharomyces cerevisiae*) tehnologijom rDNA (33, 45). Na području EU odobreno je cjepivo Fendrix, cjepivo protiv hepatitisa B (rDNA) (s adjuvansom, adsorbirano) i HBVaxPro koji su proizvedeni na stanicama kvasca (45).

1.2 Put primjene cjepiva

Jedan od izazova u postupku razvoja formulacije cjepiva je definirati odgovarajući put primjene. Cjepiva se najčešće primjenjuju parenteralno (*im.*, *sc.* ili *id.*), a sve više se razvijaju oblici za oralnu, nazalnu, sublingvalnu i bukalnu primjenu (6). Parenteralna primjena uključuje uporabu hipodermičke igle kako bi se lijek injicirao u organizam. Intarmuskularna primjena odnosi se na primjenu cjepiva u mišić, a supkutana na primjenu cjepiva u vezivno tkivo ispod dermisa. Taj put primjene se najčešće koristi za inaktivirana cjepiva zbog jednostavnosti primjene (u odnosu na intradermalnu ili intravensku) te zbog sposobnosti mišićnog tkiva i supkutanog tkiva da na mjestu primjene reagira upalnim procesom, koji aktivira ciljane stanice imunskog sustava (6).

Intradermalna primjena odnosi se na primjenu cjepiva u dermis, a jedino odobreno cjepivo za ovaj način primjene je BCG cjepivo (6). Taj put primjene smanjuje rizik od neurovaskularne ozljede. S obzirom da je koža u direktnom kontaktu s okolišem i izravno štiti tijelo od patogenih mikroba sadrži više APC-a nego mišić ili potkožno tkivo i time nudi mogućnost induciranja učinkovitijeg imunskog odgovora (6).

Prednost cjepiva namijenjenih oralnoj primjeni je neinvazivnost primjene. Odobrena cjepiva za oralnu primjenu su cjepivo protiv kolere, inaktivirano (Ducoral, proizvođača Valneva Sweden) i cjepivo protiv rotavirusa, živo (Rotarix, proizvođača GlaxoSmithKline Biologicals i RotaTeq, proizvođača Sanofi Pasteur) (1, 6). S obzirom na način primjene ključno je osigurati stabilnost antigena u kiselim uvjetima. Unatoč brojnim naporima koji su uloženi u razvoj oralnih cjepiva mali je broj oralnih cjepiva u kliničkoj primjeni što je dodatni dokaz da postoje velike prepreke koje je potrebno savladati kako bi razvili oralno cjepivo (6).

S obzirom da je dišni sustav jedan od puteva kojim patogeni mikrobi ulaze u organizam, epitel nosne sluznice posjeduje sustav kojim se inducira imunski odgovor. Odobreno cjepivo za nazalnu primjenu je cjepivo protiv influence, Flumist (proizvođač AstraZeneca), koje je živo trovalentno cjepivo sa sezonskim podjedinicama virusa influence (tip A i tip B), koji kolonizira nazalni epitel i ne raspršuje se na donje dijelove dišnih puteva (6, 46). Dizajn i razvoj formulacije polisahardnih cjepiva nazalnog

puta primjene usmjeren je na povećani unos i zadržavanje antigena u epitelu/APC nosa što se postiže primjenom mukoadhezivnih tvari, topljivih ili formuliranih u mikročestice, nanočestice ili nanogelove koje ujedno i poboljšavaju imunogenost antigena (6).

Za sve načine imunizacije osim što je potrebno razviti odgovarajući farmaceutski oblik (na primjer, suspenzije, emulzije, prašak, tablete) važan je i postupak razvoja medicinskih proizvoda potrebnih za primjenu cjepiva (npr. mikroigle) (6).

1.3 Proizvodnja virusnih cjepiva

Proces proizvodnje virusnog cjepiva ovisi o tipu antigena koji čini djelatnu tvar, a kakvoća i čistoća cjepiva ovisi o odgovarajućoj kontroli proizvodnog procesa antigena te kontroli proizvodnje gotovog cjepiva (47) .

Virusne čestice za pripravu cjepiva proizvode se na staničnim supstratima u kulturi stanica (*in vitro*) ili u pilećim embrijima (*in vivo*) (48). Prvi dio proizvodnog procesa u kojem se umnažaju virusi naziva se uzvodni dio procesa (engl. *upstream processing*), a pročišćavanje virusnih čestica nakon umnažanja naziva se nizvodni dio procesa (engl. *downstream processing*). Ključni aspekt sigurnosti primjene virusnih cjepiva odnosi se na potencijalnu prisutnost onečišćenja, stranih agensa (poput različitih virusa), komponenti hranidbenog medija (poput goveđeg serumskog albumina), staničnih komponenti (poput staničnih proteina i DNA) ili komponenti koje potječu od samih virusnih čestica (poput slobodnih virusnih proteina, praznih kapsida ili agregata virusnih čestica) (48). Stoga je glavni cilj nizvodnog procesiranja, djelatna tvar visoke učinkovitosti i sigurnosti (47).

Proizvodnja virusnog cjepiva s minimalnom količinom onečišćenja ovisi o (49) :

1. odgovarajućoj kvaliteti i čistoći početnih materijala
2. kontinuiranoj kontroli kakvoće tijekom proizvodnog postupka
3. pridržavanju validiranih proizvodnih postupaka
4. adekvatnoj provjeri kakvoće djelatne tvari

Kako bi gotovi proizvod virusnog cjepiva bio s minimalnom količinom onečišćenja uz navedeno dodatno je potrebno odabrati odgovarajuće metode testiranja na strane agense u proizvodnoj seriji. Potrebno je odrediti učestalost i vrstu metode detekcije na neobrađenoj finalnoj masi uzimajući u obzir prirodu staničnih linija koje se koriste u proizvodnji, prikazati rezultate i osjetljivost metode detekcije virusnih onečišćenja. (50).

Proizvođači cjepiva dužni su provesti provjeru kakvoće proizvodne mase cjepiva, međuprodukata i gotovog proizvoda prije puštanja lijeka u promet. Ispitivanja uključuju ispitivanje sterilnosti, identifikacijske testove, ispitivanje čistoće, potentnosti te druge testove koju upućuju na sigurnu primjenu odobrenog cjepiva (49).

1.3.1 Napredak u metodama proizvodnje djelatne tvari virusnih cjepiva

Tridesetih godina prošlog stoljeća razvijene su metode kultivacije virusa u pilećim embrijima koje se i danas koriste u proizvodnji cjepiva za ljude i životinje (48, 51). Iako se pileći embriji uvelike koriste u proizvodnji cjepiva, posebno za cjepiva protiv influence, postoje brojna ograničenja njihovoj primjeni. Primjerice dugotrajan proizvodni proces uz visoke troškove proizvodnje može rezultirati nedovoljnom opskrbom tržišta cjepivom, a postoji mogućnost pojave alergijskih reakcija koje uzrokuju proteini jaja koji su potencijalno prisutni u cjepivu (48, 52, 53)

S ciljem savladavanja navedenih nedostataka, uvedene su nove tehnologije proizvodnje koristeći stanične linije na kojima se kultiviraju virusi s ciljem proizvodnje cjepiva. 1954. godine Jonas Salk prvi puta proizvodi licencirano cjepivo protiv poliomijelitisa uzgojem poliovirusa na Vero stanicama (stanice bubrega afričkog zelenog majmuna) koji je inaktiviran formalinom, što je utjecalo na daljnji razvoj metoda proizvodnje virusnih cjepiva (48). Korištenje primarnih staničnih kultura, poput fibroblasta pilećih embrija olakšalo je proizvodnju cjepiva (primjerice proizvodnju cjepiva protiv parotitisa i varičele). Međutim, ograničena je mogućnost njihovog umnažanja i stvaranja banke primarnih stanica. Stoga se nova primarna kultura stanica priređuje pri svakoj proizvodnoj seriji cjepiva što povećava rizik od onečišćenja (48).

Sve stroži zahtjevi u proizvodnji sigurnih cjepiva utjecali su na daljnji razvoj sigurnijih, jeftinijih i učinkovitijih staničnih linija za kultivaciju virusa. U tablici 3. prikazane su najčešće korištene stanične linije u proizvodnji virusnih cjepiva za primjenu kod ljudi (48).

Tablica 3. Najčešće korištene stanične linije u proizvodnji virusnih cjepiva (preuzeto iz (48)).

Vrsta	Tip i podrijetlo staničnih linija	Odobrena virusna cjepiva
Primarne kulture stanica		
CEC	pročišćene stanice pilećih embrija	Cjepivo protiv bjesnoće (Rabipur®), cjepivo protiv influence (Vaxigrip i Vaxigrip tetra); Cjepivo protiv influence (površinski antigeni), inaktivirano (Influvac); Cjepivo protiv influence (fragmentirani virioni), inaktivirano (Fluarix); cjepivo protiv morbila (cjepivo protiv morbila, parotitisa i rubele, živo Priorix);

		cjepivo protiv velikih boginja (Imvanex); Cjepivo protiv žute groznice, živo (Stamaril)
Diploidne stanične linije		
MRC-5	ljudski fibroblasti	Cjepivo protiv varičela, zoster virusa (Varivax®; ProQuad®); cjepivo protiv poliomijelitisa (ImovaxPolio); cjepivo protiv hepatitisa A (Avaxim®Epaxal)
WI-38	ljudski plućni fibroblasti	Cjepivo protiv morbila, parotitisa, rubele i varičele, živo, ProQuad®); (cjepivo protiv morbila, parotitisa i rubele, živo M-M-RVAXPRO i Priorix)
Kontinuirane stanične linije		
MDCK	epitelne stanice bubrega psa, Madin Darby	Cjepivo protiv sezonske influence (Optaflu®), cjepiva za životinje
Vero	epitelne stanice bubrega afričkog zelenog majmuna	Pandemijsko cjepivo protiv Influence (H5N1 MedImmun; H5N1 Baxter); cjepivo protiv DTP (nestanično) i poliomijelitisa (inaktivirano) (Tetravac); cjepivo protiv poliomijelitisa (IMOVAX Polio®, PolioRIX®); cjepivo protiv rotavirusa (RotaRIX®, RotaTeq®)
PER.C6®	stanice bubrega ljudskog embrija	Kandidati cjepiva: Cjepivo protiv influence; cjepivo protiv virusa Zapadnog Nila
EB66®	Embrionalne matične stanice patke	Kandidati cjepiva: cjepivo protiv influence; cjepiva živog modificiranog virusa vakcinije Ankara (MVA-cjepivo)
AGE1.CR®	Imortalizirane stanice mrežnice mošusne patke	Kandidati cjepiva: Cjepivo protiv pandemijske influence

Diploidne stanične linije, kao što su fibrioblasti embrionalnih pluća čovjeka, MRC5 (Medical Research Council) i WI-38 stanice (Wistar Institute), dobivene su iz primarnih kultura. Stanice imaju normalan ili skoro normalan kariotip te kao i primarna kultura stanica ograničen kapacitet umnažanja koji završava senescencijom (starenjem) stanica. Koriste se u proizvodnji cjepiva protiv rubeole i vodenih kozica (50). Kontinuirane stanične linije, kao što su epitelne stanice bubrega psa (engl. *Madin Darby canine kidney*, MDCK) i epitelne stanice bubrega afričkog zelenog majmuna Vero, koje imaju neograničenu sposobnost umnažanja, pohranjuju se u banke stanica te su stoga lako dostupne i raspoložive za proizvodnju. Nadalje, neograničena sposobnost umnažanja staničnih linija olakšava

prilagodbu proizvodnje industrijskom mjerilu. Međutim, ovisno o broju pasaža, moguće su genetičke promjene koje dovode do pojave tumorskog fenotipa staničnih supstrata. Primjerice, Vero stanična linija pri visokoj razini pasaža (pasaža 162) pokazuje genetičku nestabilnost i razvija tumorski potencijal (54). Stoga se samo Vero stanice malog broja pasaža koriste za proizvodnju cjepiva protiv polio- i rotavirusa (50).

Suvremene tehnologije omogućile su razvoj novih staničnih linija, čija se svojstva mogu kroititi prema potrebama proizvodnje (55). Nove stanične linije, potječu pretežito iz ljudskih i ptičjih izvora te uključuju dvije ljudske stanične linije, HEK 293 i PER.C6®, razvijene transformacijom ili stabilnom transfekcijom stanica bubrega ljudskog embrija (HEK 293) ili embrionalnih stanica retine (PER.C6®). Dostupni stanični supstrati ptičjeg podrijetla su stanična linija embrionalnih matičnih stanica patke EB66® i stanična linija stanica mrežnice mošusne patke AGE1.CR® (56).

Odabir staničnih supstrata za proizvodnju virusnih cjepiva

Kako bi se razvio što bolji sustav kontrole kakvoće cjepiva bitna je temeljita karakterizacija staničnog supstrata odnosno karakterizacija njegovog podrijetla, genetičke stabilnosti, čistoće, prisutnosti usputnih i endogenih agenasa, tumorogenog i onkogenog potencijala. Karakterizacija i optimizacija staničnih supstrata ključni su postupci koji se provode s ciljem detaljnog pojašnjenja karakteristika djelatne tvari cjepiva (48). Pri odabiru staničnog supstrata bitno je uzeti u obzir slijedeće kriterije: permisivnost stanica za virusnu replikaciju, kvalitetu dobivenog antigena i prinos njegove proizvodnje, etička pitanja vezana uz uporabu određenih supstrata, tumorogeni i onkogeni potencijal, medij za uzgoj stanica, svojstva kulture stanica (pričvršćene za podlogu ili suspenzije), troškove proizvodnje, mogućnost prisustva stranih agenasa itd. Odabir staničnog supstrata ovisi i o vrsti cjepiva (inaktivirana ili atenuirana živa virusna cjepiva), o putu primjene cjepiva te njihovoj svrsi (prevencijska ili terapijska cjepiva) (48).

Stanični supstrati pripremaju se iz banke radnih stanica (radne sjemene stanice) (engl. *working cell bank*) čija je kultura stanica izvedena iz banke matičnih stanica (matične sjemene stanice) (engl. *master cell bank*) u skladu s općim načelima dobre proizvođačke prakse (engl. *good manufacturing practice*, GMP) i prakse dobre stanične kulture, zlatnog standarda (engl. *good cell culture practice*,

GCCP) (1, 57). Banke stanica skladište se u tekućem dušiku ili zamrzivačima pri temperaturi od -80°C, uz neophodna redovita ispitivanja fenotipskih i genotipskih karakteristika stanica čime se osigurava njihova dugoročna stabilnost (1, 48).

Predložena klasifikacija staničnih supstrata utemeljene na procjeni rizika

Prema uputama Centra za istraživanje i vrednovanje bioloških lijekova (engl. *Center for Biologics Evaluation and Research*, CBER) te njegovog savjetodavnog odbora za cjepiva i srodne biološke proizvode (engl. *Vaccines and Related Biological products Advisory Committee*, VRBPAC) stanični supstrati podijeljeni su u pet kategorija (56, 57). Kategorija 1 uključuje ljudske stanice poznatog mehanizma transformacije. Primjer su stanične linije diploidnih sojeva MRC5 i WI-38. Kategorija 2 uključuje rano pasažirane diploidne stanice kao što su HEK293 i PER.C6® stanice. Kategorije od 3 do 5 predstavljaju primarne stanice životinjskog podrijetla koje se transformiraju spontano, primjeri su Vero stanice, CV-1 stanice i BSC -1 stanice, i stanice ljudskog podrijetla kao što su HeLa i HUT-78 stanice koje se koriste za umnažanje virusa HIV-a u istraživanju za proizvodnju cjepiva protiv HIV-a (56, 58).

Međutim, navedene kategorije staničnih supstrata nisu kategorizirane prema kriterijima od ključnog značaja za procjenu rizika kao što su fenotip, genotip, kariotip, permisivnost stanica za endogene i poznate vrste stranih agensa, tumorogeni i onkogeni potencijal. Kategorizirane su prema podrijetlu staničnih linija, kapacitetu umnažanja te mogućim poteškoćama koje se mogu javiti pri procjeni cjepiva od strane regulatornih tijela (56). Klasifikacija staničnih supstrata trebala bi se temeljiti na procjeni rizika i mogućem smanjenju rizika vezano za stanični supstrat i tip cjepiva (živo atenuirano virusno cjepivo, inaktivirano cjepivo ili rekombinantna cjepiva). Očito je da živa atenuirana virusna cjepiva dobivena iz netumороgenih i neonkogenih primarnih staničnih supstrata izoliranih iz eksperimentalnih životinja slobodnih od patogena se klasificiraju u nižoj kategoriji rizika od onih proizvedenih iz tumorogenih i/ili onkogenih diploidnih i kontinuiranih staničnih linija. Što potvrđuje da je podrijetlo staničnog supstrata važno za klasifikaciju. Ljudski stanični supstrati više su klasifikacije od staničnih supstrata dobivenih od glodavaca ili drugih vrsta, jer je konačni proizvod

cjepivo za primjenu u ljudi. Ograničen broj poznatih egzogenih i endogenih virusa neljudskog podrijetla mogu zaraziti čovjeka. Međutim, mnogi patogeni ljudski ili životinjski virusi mogu biti prisutni i umnažati se u stanicama životinjskog podrijetla. Procjena rizika trebala bi uključivati procjenu virusa koji mogu inficirati stanice koje se koriste u proizvodnji te tropizam prethodno identificiranog virusa, poznatih endogenih latentnih virusa i retrovirusa dodatno uključujući znanje o mogućim mehanizmima transformacije (ako je primjenjivo). Što detaljnija karakterizacija kariotipa staničnog supstrata, sposobnosti rasta/umnažanja staničnog supstrata, tumorogenog i onkogenog staničnog supstrata značajno pridonosi uspješnoj procjeni rizika (56).

2 CILJ ISTRAŽIVANJA

S obzirom da je proizvodnja cjepiva povezana s korištenjem biološkog materijala životinjskog ili ljudskog podrijetla, onečišćenje slučajnim agensima (virusima) koji su prisutni u sirovim materijalima ili koji se slučajno uvedu tijekom proizvodnog procesa može se pojaviti u različitim fazama proizvodnje cjepiva. Cjepiva mogu biti zdravstveno neispravna zbog povrata virulencije atenuiranih virusa koji se koriste kao djelatna tvar ili preostale patogenosti kao posljedice nepotpune ili neispravne virusne inaktivacije. Kroz povijest je zabilježeno nekoliko slučajeva onečišćenja cjepiva za primjenu u ljudi i životinja što je posljedično dovelo do promjena u proizvodnim procesima, kontroli kakvoće te strožim i detaljnijim zahtjevima regulatornih tijela u vidu virusne sigurnosti cjepiva. Osigurati cjepivo bez nepoželjnih virusnih onečišćenja postao je pravi izazov za proizvođače i regulatorna tijela zbog sve većeg broja ciljnih vrsta virusa za cjepiva, raznolikosti podrijetla bioloških materijala koji se koriste u proizvodnji virusa (antigena) i iznimno velikog broja poznatih i nepoznatih virusa koji mogu potencijalno onečistiti cjepivo (59).

Cilj ovog specijalističkog rada je pregledno opisati regulatorne zahtjeve koji su propisani s ciljem osiguravanja cjepiva od onečišćenja stranim agensima-virusima, a što značajno određuje njihovu kakvoću i sigurnost primjene. Prikazat će se konvencionalne metode detekcije virusa kao stranih agensa u cjepivima te usporediti sa suvremenim metodama. Također će se opisati razvoj suvremenih metoda za detekciju potencijalnih virusnih onečišćenja.

3 MATERIJALI I METODE - SUSTAVNI PREGLED SAZNANJA O TEMI

Metoda istraživanja teorijskog rada temelji se na pretraživanju literature elektroničkim putem. Pretražene su bibliografska baza podataka (PubMed) i baza podataka s cjelovitim tekstom (Science Direct). Literatura je pretražena prema temi istraživanja, predmetu istraživanja i časopisu. Informacije o odobrenim cjepivima prikupljene su pretraživanjem raspoloživih *online* baza podataka Agencije za lijekove i medicinske proizvode (HALMED), Europske agencije za lijekove (EMA) i Američke agencije za hranu i lijekove (FDA). Pretraživanjem mrežnih stranica HALMED-a, EMA-e i FDA-a te Svjetske zdravstvene organizacije (SZO) i Međunarodne konferencije o harmonizaciji (ICH) dobiven je uvid u regulatorne smjernice vezane uz cjepiva. Prikupljeni podaci su kritički sagledani te sveobuhvatno prikazani kao pregledni rad kako bi se prikazala važnost primjene zakonskih okvira s ciljem osiguravanja cjepiva od onečišćenja stranim agensima, a što određuje njihovu kakvoću i sigurnost primjene.

3.1 Strani agensi u cjepivu

Cjepiva su imunološki lijekovi koji su podskupina bioloških lijekova. Djelatna tvar cjepiva je biološka tvar proizvedena ili izlučena iz biološkog izvora poput mikroba, organa i tkiva biljnog ili životinjskog podrijetla, stanice ili biotehnološke stanične tvorevine (stanični supstrati, rekombinantni ili ne, uključujući matične stanice). Za karakterizaciju i utvrđivanje kakvoće biološke tvari potrebna su fizičko-kemijska i biološka ispitivanja zajedno s podacima o postupku proizvodnje i njegove kontrole (5).

Strani agens je onečišćenje u obliku mikroba: bakterije, gljivice, mikoplazme/spiroplazme, mikobakterije, rikecije, protozoe, parazita, transmisivnih spongiformnih encefalopatija i virusa koji se slučajno mogu uvesti u proizvodnju iz sjemenskih sojeva, banka stanica i drugih bioloških tvari od kojih se proizvodi djelatna tvar (5). Virusni agens je bilo koji drugi agens izuzev samog virusa odnosno soja sadržanog i navedenog na pakiranju virusnog cjepiva (59).

Virusi kao strani agensi u cjepivima mogu se podijeliti u tri skupine: 1) "poznati poznati" agensi koji su poznati i očekuju se u uzorku te se ispituje njihova prisutnost, 2) "poznati nepoznati" agensi koji su poznati i može se ispitati njihova prisutnost, ali ne moraju nužno biti prisutni u uzorku i 3) "nepoznati nepoznati" agensi koji su još nepoznati i zato se niti ne može ispitati njihova prisutnost u uzorku (60).

Prema *Master list species* 2015. godine koju izdaje *International Committee on Taxonomy of Viruses* poznato je 3700 virusnih vrsta (61). Međutim, broj virusnih vrsta na planeti može biti veći od 150.000 (62). S obzirom na navedeno velika većina virusa još uvijek spada u kategoriju "nepoznatih" virusa (60). Ako je prisutnost potencijalno patogenih stranih agensa neizbježna, odgovarajući biološki materijali koji se koriste u proizvodnji cjepiva se smiju daljnje obrađivati ukoliko se osigura uklanjanje i/ili inaktivacija virusa. Navedeno je proizvođač obavezan navesti u dijelu dokumentacije o ocjeni sigurnosti od onečišćenja virusima (Modul 3 dio 3.2.A.)(5).

3.2 Potencijalni izvori virusnih onečišćenja u proizvodnji cjepiva

Virusna onečišćenja u proizvodnji cjepiva proizlaze ili iz staničnog supstrata ili slučajnim uvođenjem virusa tijekom proizvodnog procesa (47, 50).

U banci matičnih stanica (matičnim sjemenim stanicama) mogu se pojaviti virusi koji uzrokuju latentne ili trajne virusne infekcije (primjerice virus herpesa) ili endogeni retrovirus čiji se genom integrira u dio staničnog genoma domaćina.

U banci matičnih stanica (matične sjemenice) virusi se mogu uvesti na nekoliko načina: 1) korištenjem staničnih supstrata dobivenih od zaraženih životinja; 2) korištenjem virusa za uspostavljanje stanične linije; 3) korištenjem onečišćenih bioloških reagensa, kao što je životinjski serum; 4) onečišćenjem tijekom uzgoja stanica (50). Mogući načini uvođenja virusa u proizvodni postupak su 1) korištenje onečišćenih bioloških reagensa, kao što su životinjski serum; 2) korištenje virusa za ekspresiju specifičnih gena koji kodiraju željeni protein; 3) upotreba onečišćenog reagensa; 4) korištenje onečišćenih pomoćnih tvari u proizvodnji lijeka; 5) onečišćenje nepropisnim rukovanjem. Vrlo je važno pratiti parametre staničnih kultura kako bi se slučajna virusna onečišćenja otkrila na vrijeme (50). Ovisno o podrijetlu staničnih supstrata razlikuju se i moguće vrste onečišćenja. Primjerice stanični supstrati ptičjeg podrijetla, a osobito kokošnjeg, mogu biti onečišćeni retrovirusima, poput virusa ptičje leukoze ili virusa retikuloendotelioze koji se ne ugrađuje u genom domaćina, već se nalazi u genomu herpesvirusa koji uzrokuje Marekovu bolest u peradi, ili bakterijama kao što su *Mycoplasma gallisepticum* ili *Mycoplasma synoviae* (48).

Osim navedenog kao potencijalni izvor onečišćenja bitno je uzeti u obzir i tkivo iz kojeg je dobiven stanični supstrat te postupak inaktivacije virusa u proizvodnji virusnih cjepiva. Na primjer, stanice dobivene iz tumora mogu sadržavati onkogene virusne sekvence, poput imortalizirane stanične linije HeLa dobivene iz cervikalnog karcinoma koje sadrži HPV. To je također slučaj za stanice transformirane pomoću adenovirusa tipa 5, kao što su ljudske stanične linije (HEK-293) i PER.C6® (48).

Potrebno je definirati povijest bolesti donora izvornog tkiva iz kojeg potječu stanični supstrati ljudskog podrijetla ili status patogene životinje u slučaju staničnih supstrata životinjskog podrijetla. Vrlo je važno razmotriti koji virusi mogu biti prisutni u sirovinama životinjskog ili ljudskog podrijetla, a koje se koriste za uzgoj staničnog supstrata bilo prilikom uspostave banke stanica ili proizvodnje djelatne tvari (primjerice životinjski serum, životinjski ili ljudski tripsin). Laboratorijsko osoblje također može predstavljati izvor virusnog onečišćenja. Posebnu pozornost treba usmjeriti na metode otkrivanja/detekcije poznatih virusa (stranih agensa) koji mogu zaraziti čovjeka, a koje je teže detektirati (primjerice simian virus 40) (50).

Životinje od kojih se dobivaju primarne stanične kulture (pročišćene stanice pilećih embrija) moraju biti bez specifičnih patogena (engl. *specific pathogen free*, SPF), a što se osigurava posebnim uvjetima uzgoja. Grupe (jata, stada, ili kolonije) se uzgajaju bez kontakta sa drugim životinjama što se naziva „genetički zatvorene“ grupe (jata, stada, ili kolonije). Prema Ph. Eur. je propisano da embrionirana kokošja jaja koja se koriste u proizvodnji virusnih cjepiva moraju biti iz SPF jata kokoši (50).

3.3 Zakonski propisi o sigurnosti od virusnog onečišćenja u cjepivima

Regulatorne zahtjeve za ispitivanje sigurnosti staničnih supstrata postavljaju specifičnim smjernicama regulatorna tijela kao EMA i FDA te organizacije kao SZO i Međunarodna konferencija o harmonizaciji (ICH). Određeni zahtjevi propisani su i u Europskoj i Američkoj farmakopeji (50, 56). Specifične regulatorno-znanstvene smjernice koje su usvojene od većine nacionalnih regulatornih tijela u svrhu sprečavanja virusnih onečišćenja u proizvodnji cjepiva/bioloških lijekova, a koje su dostupne na mrežnim stranicama EMA-e prikazane su u tablici 4.

Tablica 4. Specifične smjernice za cjepiva/biotehnoške lijekove.

<u>Naziv smjernice</u>	<u>Oznaka</u>	<u>Datum izdavanja (engl. <i>published date</i>, PD) Datum stupanja na snagu (engl. <i>effective date</i>, ED)</u>
<i>Quality of Biotechnological: Products Viral safety Evaluation of Biotechnology Products derived from Cell Lines of Human or Animal Origin</i>	CPMP/ICH295/95 ICH Topic Q5A	PD Ožujak 1997. ED Listopad 1997.
<i>Quality of Biotechnological: Analysis of the expression construct in cells used for production of rDNA derived protein products</i>	CPMP/ICH/139/95 ICH Topic Q5B	PD Prosinac 1995. ED Sranj 1996.
<i>Quality of Biotechnological: Derivation and characterisation of cell substrates used for production of biotechnological/biological products</i>	CPMP/ICH/294/95 ICH Topic Q5D	PD Rujan 1997. ED Ožujak 1998.
<i>Guideline on virus safety evaluation of Biothnological investigation al medicinal products</i>	CHMP/BWP/398498/2 005	ED Veljača 2009.
<i>Virus validation studies: the design, contribution and interpretation of studies validating the inactivation and removal of viruses</i>	CPMP/BWP/268/95	PD Veljača 1996. ED kolovoz 1996.

Cilj specifičnih smjernica navedenih u tablici 4. je pružiti proizvođačima sveobuhvatan pristup u procjeni rizika pri odabiru i karakterizaciji ishodnih sirovina, kontroli međuprodukata i konačnog

proizvoda uz planiranje i validiranje proizvodnog procesa u svrhu proizvodnje sigurnog i djelotvornog cjepiva (48).

Smjernica, "*ICH Topic Q 5A (R1) Quality of Biotechnological Products: Viral Safety Evaluation of Biotechnology Products Derived from Cell Lines of Human or Animal Origin*" propisuje generalni pristup kako osigurati siguran proizvod s obzirom na potencijalna virusna onečišćenja primjenom virusnih testova, zatim procjenu učinkovitosti uklanjanja virusa i inaktivacije virusa. Razvila su se tri glavna komplementarna pristupa za kontrolu potencijalnih virusnih onečišćenjima u proizvodnji cjepiva: 1) odabir stanične linije i ispitivanje prisutnosti virusnog onečišćenja u staničnoj liniji i drugim sirovinama (primjerice sastavnice hranidbenog medija) 2) procjena uklanjanja virusa u proizvodnom procesu i 3) testiranje proizvoda na prisutnost zaraznih virusa u odgovarajućim koracima proizvodnje (što također propisuje i Ph. Eur. pod poglavljem 5.1.7 "Viral safety"). Svrha navedene smjernice je davanje općeg okvira validiranih laboratorijskih postupaka za dokazivanje ciljanih virusa kako bi osigurali virusnu čistoću proizvoda. Metode testiranja cjepiva na prisutnost stranih agensa su slične za cjepiva za primjenu u ljudi i veterinarsku primjenu (9).

Osim regulatorno-znanstvenih smjernica dostupnih na mrežnim stranicama EMA-e, SZO 1998. godine objavila je dokument iz serije tehničkih izvješća (*WHO Technical Report Series*, No. 878) "*Recommendations for the evaluation of animal cell cultures as substrates for the manufacture of biological medicinal products and for the characterization of cell banks*" te je preuzela vodeću ulogu u globalnom procesu savjetovanja u postavljanju standarda za ocjenu sigurnosti i kvalitete cjepiva i drugih bioloških lijekova proizvedenih iz staničnih supstrata životinjskog podrijetla. Stručno povjerenstvo o biološkoj standardizaciji SZO (engl. *Expert Committee on Biological Standardization*, ECBS) 2010. godine usvojilo je spomenuti dokument „*Recommendations for the evaluation of animal cell cultures as substrates for the manufacture of biological medicinal products and for the characterization of cell bank*“. Osim navedenog dokumenta na stranicama SZO se nalaze i izvješća studijske grupe SZO „*Report of the WHO Study Group on Cell Substrates for the Production of Biologicals*“ koja se prvi put sastala 2007. godine u Ženevi, Švicarska te 2009. godine u Bethesda, SAD (63). Studijska grupa SZO je osnovana 2006. godine s ciljem revizije zahtjeva SZO za korištenje životinjskih stanica kao supstrata za proizvodnju cjepiva i drugih bioloških lijekova, odnosno revizije

dokumenta WHO TRS, 878. Osim navedenog SZO u aneksu II, „*Scientific principles for regulatory risk evaluation on finding an adventitious agent in a marketed vaccine*“ glavnog dokumenta SZO Technical Reports Series No. 9333 iz 2015. godine daje znanstvene smjernice nacionalnim regulatornim tijelima na koji način evaluirati procjenu rizika ukoliko se dokaže da postoji onečišćenje odnosno strani agens u odobrenom cjepivu. Nacionalno regulatorno tijelo u procjeni rizika od potencijalnog onečišćenja virusom ili drugim stranim agensom u odobrenom cjepivu oslanja se na dokumentaciju o lijeku predanu i sastavljenu od proizvođača. Zadatak nacionalnog regulatornog tijela je ocijeniti dokumentaciju o lijeku i procijeniti je li u skladu sa načelima upravljanja rizika kvalitete (engl. *quality risk management principles*) sukladno propisanim smjernicama međunarodne konferencije ICH-a i SZO-a. Osim navedenog, proizvodni proces cjepiva/biološkog lijeka mora udovoljavati zahtjevima Direktive Komisije 91/356/EEC kojom su utvrđena sva načela i smjernice dobre proizvođačke prakse za lijekove za ljudsku upotrebu, a koje su za cjepiva i ostale biološke lijekove opisane u EudraLex-u Volumen 4 (64).

Europska farmakopeja

1970. godine prvi je put u Ph. Eur. - u uveden zahtjev za ispitivanje ishodnih sirovina za proizvodnju cjepiva kao i samih cjepiva, koji su pokrivali i testiranja u vidu zaštite od stranih agensa za SPF jata pilića od kojih su se dobivala oplodena kokošja jaja koja služe kao supstrat za umnažanje nekih virusa u proizvodnji virusnih cjepiva. Takav pristup pokrenula je Ph. Eur. što je ujedno bio početak znanstvene osnove koja je doprinijela kvaliteti cjepiva. Od 1970 g. do danas sve su detaljniji zahtjevi koji se odnose na virusnu čistoću koja je od velike važnosti kako bi virusna cjepiva bila kvalitetna i sigurna za primjenu. Osnova samog zahtjeva za virusnu čistoću cjepiva jest ta da se nastoje popisati svi strani agensi koji bi se morali testirati te opisati testove (metode) kojima bi se popisani agensi mogli detektirati.

Ph. Eur. (izdanje 8.0) u poglavljima 2.6.24. “Ptičje virusno cjepivo: testovi na strane agense u sjemenskim serijama” i 2.6.25. “Ptičje virusno cjepivo: Ispitivanje stranih agensa u serijama gotovih proizvoda”) te EMA objavili su službeni popis potencijalnih stranih agensa, koji se moraju ispitati prilikom proizvodnje cjepiva u svrhu sigurnog i kvalitetnog proizvoda - cjepiva. Također u dijelu Ph.

Eur. u Općim uputama pod Cjepiva za životinje, u dijelu “ testovi gotove serije”, navodi se između ostalog pod 3-5. *Strani agensi*, koje mjere bi se trebale poduzeti kako bi se gotov proizvod smatrao sigurnim od sadržavanja potencijalnih zaraznih stranih agensa (65).

Regulatorni zahtjevi za virusna onečišćenja u cjepivima prema propisima Sjedinjenih Američkih Država (SAD)

U SAD-u, nacionalni propisi za cjepiva su kodificirani u dijelovima 200 i 600, 21. Zakona o federalnim propisima (engl. *Code of Federal Regulation*, CFR). U pojedinim dijelovima Američke farmakopeje (USP) uvedene su nove validirane analitičke i preparativne metode. Točnije 1. prosinca 2011. godine USP je usvojio dijelove USP 1235 (cjepiva za ljudsku upotrebu - općenita razmatranja), USP 1037 (metode ispitivanja virusnih onečišćenja) i USP 1050 (procjena sigurnosti biotehnoloških proizvoda dobivenih iz staničnih linija ljudskog ili životinjskog podrijetla). 16. svibnja 2001. godine sastao se savjetodavni odbor FDA Centra za evaluaciju i istraživanje bioloških lijekova (engl. *Center for Biologics Evaluation and Research*, CBER) kako bi razmotrili cjepiva i pitanja vezana uz biološku sigurnost cjepiva uz raspravu o novim staničnim supstratima kao što su PER.C6 i 293 (66). U rujnu 2006. godine FDA je izradila nacrt dokumenta "Smjernice za industriju: Karakterizacija i kvalifikacija staničnih supstrata i drugih bioloških ishodnih sirovina korištenih u proizvodnji virusnih cjepiva za prevenciju i liječenje zaraznih bolesti", koji je usvojen u veljači 2010. godine (47).

Osnovni zahtjevi karakterizacije staničnih supstrata su slični prema propisima EMA, SZO, FDA, USP, ICH i Ph. Eur., a zahtijevaju dokaze o identitetu, stabilnosti i čistoći staničnog supstrata. Identitet i stabilnost se dokazuje analitičkim metodama prikazivanjem specifičnih profila izoenzima, citogenetskih markera i/ili kariotipom stanice određenih vrsta staničnih supstrata, a također uključuje i analizu fragmenata DNA (1, 67), (propisano prema Ph. Eur., FDA, SZO) (47) i/ili polimorfizam dužine restrikcijskih fragmenata (engl. *Restriction Fragment Length Polymorphism*, RFLP), propisano prema ICH (50) i tipizaciju leukocitnih antigena (engl. *Human Leukocyte Antigen*, HLA) (propisano prema Ph. Eur., FDA, SZO), imunološka svojstva (propisano prema ICH, Ph. Eur.) i životni vijek (propisano prema Ph. Eur.) (68).

Iako su zahtjevi za karakterizaciju staničnih linija i testovi *in vivo* i *in vitro* na strane agense slični u svim regulatornim propisima, izbor životinja (i pilećih embrija) koje se koriste u ispitivanju su različiti. Prema Ph. Eur. (u dijelovima 5.2.3. *Cell substrate for the production of vaccines for human use* i 2.6.16. *Tests for extraneous agents in viral vaccines for human use*), USP-u (USP-NF < 1235 > *Vaccines for human use—general considerations* I USP-NF < 1237 > *Virology test methods*), ICH-u (*ICH Harmonised Tripartite Guideline: viral safety evaluation of biotechnology products derived from cell lines of human or animal origin Q5A(R1)*) životinjski sustavi za ispitivanje stranih agensa uključuju okoćene miševe, odrasle miševe, zamorce i oplodena kokošja jaja, a prema FDA, i SZO dodatno su uključeni i kunići kao pokusne životinje (48, 69).

3.4 Propisane metode ispitivanja virusnih onečišćenja

Kako bi prilikom proizvodnje i kontrole kvalitete u proizvodnji virusnih cjepiva/bioloških lijekova osigurali odsutnost stranih agensa koriste se *in vivo* i *in vitro* testovi na prisutnost stranih agensa (virusa). Uobičajene metode za otkrivanje prisutnosti stranih agensa (virusa) u staničnim kulturama su transmisijaska elektronska mikroskopija (TEM), ispitivanje aktivnosti reverzne transkriptaze (relevantno za retroviruse) odnosno kvantitativna metoda PERT-test (engl. *Product Enhanced Reverse Transcriptase*, PERT- test) te ispitivanje infektivnosti u staničnim kulturama *in vitro* i testiranje infektivnosti u životinja *in vivo* (70). *In vitro*, u staničnim kulturama se mikroskopski analizira citopatološki učinak (engl. *cytopathic effect*, CPE), te se testira prisutnost hemaglutinirajućih (HA) ili hemadsorpirajućih (HAD) agensa. U testovima *in vivo* određene pokusne životinje se cijepu te se bilježi njihov mortalitet, a određena tkiva se testiraju na prisutnost HA. *In vivo* testovi su potrebni za otkrivanje novih virusa, odnosno emergentnih virusa i kako bi nadopunili usko specifične virusne testove kao što su testovi lančane reakcije polimeraze (engl. *polymerase chain reaction*, PCR) (70). Djelokrug regulatorno-znanstvenih smjernica i propisa za metode detekcije prisutnosti stranih agensa u biološkim proizvodima prikazane su tablici 5 (71).

Tablica 5. Djelokrug regulatornih propisa za metode detekcije prisutnosti stranih agensa u biološkim lijekovima/cjepivima.

Propisi	Područje primjene propisa
<i>FDA Guidance for Industry</i> (Veljača 2010). <i>Characterization and Qualification of Cell Substrates and Other Biological Materials Used in the Production of Viral Vaccines for Infectious Disease Indications</i> (72)	Stanični supstrati ljudskog ili životinjskog podrijetla, virusne sjemenke serije i drugi biološki materijali (uključujući međuprodukte cjepiva), proizvodnju živih atenuiranih virusa, inaktiviranih cijelih ili podjedinica viriona, pročišćenih rekombinantnih proteina
<i>ICH Harmonised Tripartite Guideline Q5A</i> (Rujan 1999). <i>Viral Safety Evaluation of Biotechnology Products Derived from Cell Lines of Human or Animal Origin</i> (73)	Proizvodi dobiveni iz staničnih kultura, kao što su interferoni, monoklonska protutijela, proizvodi dobiveni tehnologijom rDNA, uključujući podjedinice rDNA, sva živa atenuirana cjepiva te žive vektore dobivene genetičkim inženjersvom
<i>Ph. Eur. Chapter 5.2.3—Cell Substrates for the Production of Vaccines for Human Use, 8th ed</i> (67)	Diploidne stanične linije i kontinuirane stanične linije koje se koriste u proizvodnji cjepiva za primjenu u ljudi.
<i>Ph. Eur. Chapter 2.6.16—Tests for Extraneous Agents in Viral Vaccines for Human Use, 8th ed.</i> (74)	Virusne sjemenke serije i virusne žetve proizvedene na životinjskim stanicama i jajima

<p><i>WHO. Recommendations for the evaluation of animal cell cultures as cell substrates for the manufacture of biological medicinal products and for the characterization of cell banks— TRS 978, Annex 3, 2013, adopted by the</i></p> <p><i>Expert Committee on Biological Standardization (ECBS),</i> Listopad 2010 (69)</p>	<p>Životinjski stanični supstrati korišteni u proizvodnji bioloških lijekova (uključuje cjepiva i monoklonska protutijela)</p>
--	--

Konvencionalne metode detekcije

Konvencionalne metode ispitivanja u uvjetima *in vitro* i *in vivo* propisane su Ph. Eur. u poglavlju 2.6.16. „*Tests for extraneous agents in viral vaccines for human use*“ (74) i u FDA smjernici „*Characterization and Qualification of Cell Substrates and Other Biological Materials Used in the Production of Viral Vaccines for Infectious Disease Indications*“ (72), a uključuju *in vitro* testove na staničnim kulturama i *in vivo* testove na okoćenim miševima, odraslim miševima, zamorcima, kunićima i pilećim embrijima. Ukoliko se testovima potvrdi prisutnost stranog agensa (virusa) u uzorku, virus mora biti neutraliziran prije testiranja tvorbe specifičnih protutijela u životinja (75).

3.4.1 *In vivo* metode ispitivanja virusnih onečišćenja

In vivo ispitivanja prisutnosti virusnog onečišćenja provode se na staničnom supstratu, staničnim kulturama, virusnoj sjemennoj seriji¹ i virusnoj žetvi². Uzorak virusne sjemenne serije uzima se za vrijeme virusne žetve te se prije ispitivanja virus u uzorku neutralizira sa specifičnim protuvirusnim protutijelima (74, 75). *In vivo* metodom se ispituju strani agensi (virusi) koji se ne mogu propagirati *in vitro* ili nisu citopatogeni ili su virusi koji uzrokuju imunološki posredovane bolesti, kao npr. virus limfocitnog koriomeningitisa (70). Popis virusa koji se ispituju *in vivo* metodom nalazi se u tablici 6.

Ispitivanja na odraslim miševima

Testni uzorak se inokulira *ip.* (0,5 mL po mišu) i *ic.* (0,03 mL po mišu) u najmanje 10 odraslih miševa (u SAD-u najmanje 20 odraslih miševa) te se životinje promatraju najmanje 21 dan. Ukoliko miš uginе nakon prvih 24 sata, provodi se obdukcija i histopatološkom analizom tkiva utvrđuje je li došlo do virusne infekcije. Kako bi se utvrdilo pokazuju li miševi znakove bolesti povezane sa virusnom infekcijom promatra se fizičko stanje miševa (primjerice gubitak na težini, proljev, itd.). Ukoliko neki od odraslih miševa prežive period promatranja, dodatno se 21 dan promatra najmanje 5 odraslih miševa koji su *ip.* i *ic.* inokulirani homogenom suspenzijom tkiva miševa koji su preživjeli prvotni period promatranja. Uzorak je valjan (odnosno test nije pozitivan na prisutnost virusa) ako miševi ne pokazuje znakove virusne infekcije (odnosno ako u periodu promatranja preživi najmanje 80% od izvorno i ponovno inokuliranih odraslih miševa) (74, 75).

Ispitivanje na okoćenim miševima

¹ prema Hrvatskoj farmakopeji sustav virusne sjemenne serije je sustav serije sjemenog soja virusa sukladno kojem su naredne serije proizvoda dobivene iz iste serije matičnog sjemenog soja. Za rutinsku proizvodnju se serija radnog sjemenog soja može pripremiti iz serije matičnog sjemenog soja.

² prema Hrvatskoj farmakopeji pojedinačna žetva – materijal izveden jednom ili više puta iz jedne proizvodne kulture stanica inokulirane istom radnom sjemenom serijom ili suspenzijom izvedenom iz radne sjemenne serije, inkubirane i požnjete u jednoj proizvodnoj obradi

U najmanje 20 tek okoćenih miševa, ne starijih od 24 sata, testni uzorak se inokulirana *ip.* (0,1 mL po mišu) i *ic.* (0.01 mL po okoćenom mišu). Životinje se promatraju najmanje 14 dana. Okoćeni miševi koji su uginuli nakon prva 24 sata ispituju se obdukcijom i histopatološkom analizom tkiva utvrđuje se je li došlo do virusne infekcije. U slučaju da miševi pokazuju znakove bolesti, promatra se fizičko stanje miševa kako bi se utvrdilo je li došlo do virusne infekcije. Ukoliko neki od okoćenih miševa prežive period promatranja dodatno se 21 dan promatara najmanje 5 odraslih miševa *ip.* i *ic.* inokuliranih homogenom suspenzijom tkiva svih miševa koji su preživili prvotni period promatranja. Uzorak je valjan ako okoćeni miševi ne pokazuju znakove infekcije i prežive period promatranja odnosno test nije pozitivan na prisutnost virusa ako u periodu promatranja preživi najmanje 80% od izvorno inokuliranih okoćenih miševa i ponovno inokuliranih odraslih miševa (74, 75).

Jedan od primjera *in vivo* ispitivanja prisutnosti virusa u uzorku proveden je u dvije faze (70). U prvoj fazi *in vivo* ispitivanja testirali su prisutnost virusa u nerazrijeđenom uzorku ispitivane virusne zalihe (engl. *research virus stocks*, RSV) herpesvirusa. Inokulirani su okoćeni miševi (*ip.* sa 0,1 mL i *ic.* 0,01 mL) i odrasli miševi (*ip.* sa 0,5 mL i *ic.* sa 0,3 mL) te je određen postotak smrtnosti ili bolesti uzrokovane virusom u određenom vremenskom periodu (predviđeno je promatranje 21 dan za odrasle miševe, odnosno 14 dana za okoćene miševe). Osjetljivost metode određuje se granicom detekcije (engl. *a limit of detection*, LOD) prisutnosti virusa u uzorku ponovnom inokulaciju miševa sa 10 puta razrijeđenom serijom RSV-a. LOD je definiran kao najmanja koncentracija RSV-a (inokuluma) koja uzrokuje smrtnost ili bolest u više od 20 % ispitivanih životinja. Ukratko, 20 miševa, odnosno 20 okoćenih miševa bilo je inokulirano s po 9.5×10^6 jedinica koje stvaraju plak (engl. *plaque-forming unit*, PFU) nerazrijeđenog RVS. Treći dan po inokulaciji okoćenih i odraslih miševa zabilježena je 100%-tna smrtnost ispitivanih okoćenih miševa i 75%-tna smrtnost odraslih miševa. Kako bi dokazali da je smrtnost miševa povezana sa virusom HSV, žrtvovani miševi su podvrgnuti obdukciji i patohistologiji tkiva. Kod odraslih i okoćenih miševa uočene su lezije tkiva, točnije lezije mozga te oštećena/zaražena jetra u okoćenih miševa što su također indikatori infekcije s HSV-om. S obzirom da je test pokazao pozitivan rezultat na prisutnost HSV-a, dodatno se ispitala i granica odnosno koncentracija virusa u uzorku pri kojoj se detektira prisutnost virusa HSV-a, a iznosi 100 PFU (70).

Ispitivanje na zamorcima

U najmanje 5 zamoraca *ip.* se inokulira s 5,0 mL ispitivanog uzorka te se životinje promatraju najmanje 42 dana. Životinje koje su nakon prvih 24 sata uginule podvrgavaju su obdukciji i patohistologiji tkiva kako bi se utvrdilo je li došlo do virusne infekcije. U slučaju da pokazuju znakove bolesti makroskopski se promatra fizičko stanje zamoraca kako bi se utvrdilo je li došlo do virusne infekcije. Uzorak je valjan ako zamorci ne pokazuju znakove infekcije i prežive period promatranja, odnosno test nije pozitivan na prisutnost virusa ako u periodu promatranja preživi najmanje 80% od izvorno inokuliranih zamoraca (74, 75).

3.4.2 *In vitro* metode detekcije virusnih onečišćenja

3.4.2.1 *Ispitivanje prisutnosti stranih agensa u virusnoj sjemenoj seriji i staničnim kulturama*

Kontrola virusne sjemene serije i virusne žetve

Uzorak virusne sjemene serije uzima se za vrijeme virusne žetve. Uzorak se prije uporabe neutralizira specifičnim protuvirusnim protutijelima. Ukoliko se uzorak odmah ne upotrijebi za ispitivanje prisutnosti stranih agensa, čuva se na temperaturi nižoj od - 40°C. Volumen neutraliziranog uzorka (ako drugačije nije propisano) od 50 mL (500 doza cjepiva) inokulira se u kontinuiranu ili diploidnu staničnu liniju. Ispitivanje na prisutnost stranih agensa neutralizirane žetve virusa ispituje se na staničnoj kulturi (kontinuiranoj, diploidnoj i primarnoj staničnoj liniji) na kojoj se specifični virus uzgaja. Stanice se inkubiraju na 36±1°C te se promatraju 14 dana. Virusna sjemena serija ili pojedinačna žetva smatra se ispravnom (odnosno test nije pozitivan na prisutnost virusa) ukoliko je 80% stanica u kulturi vijabilno u periodu promatranja (74, 75).

Virusne sjemenske serije propagirane u primarnim staničnim linijama ili pilećim embrijima dodatno se testiraju na prisutnost virusa s kojim bi mogli biti zaražene ptice, kao što su retrovirusi: virus ptičje mijeloblastoze, (engl. *Avian Myeloblastosis Virus*, AMV-RT) i virus ptičje leukoze (engl. *avian leukosis virus*, ALV). Jedna skupina oplođenih SPF jaja, starosti 9 do 11 dana, inokulira se s uzorkom od 0,5 mL u alantoisnu šupljinu, dok se druga skupina SPF jaja, starosti 5 do 7 dana inokulira u žumanjčanu vrećicu. Jaja se inkubiraju 7 dana. Virusna sjemena serija ili žetva je valjana ukoliko u tekućini alantoisne šupljine i žumanjčane vreće nema hemaglutinirajućih virusa, odnosno ako makroskopskim pregledom (npr. lampiranjem) zametka i korioalantoisne membrane nisu utvrđene patološke promjene (npr. virusne kvržice). Uzorak je valjan ako 80 % inokuliranih jaja preživi period praćenja od 7 dana (74).

Kontrola stanične kulture za umnažanje virusa

14 dana nakon inuokluacije, stanične kulture se mikroskopski pregledavaju na prisutnost virusa koji ako su prisutni i umnažaju se u staničnoj kulturi uzrokuju citopatološki učinak odnosno dovode do

tipične degeneracije inficiranih stanica (npr. pojave granulacije stanica, pojave malih sincicija ili propadanja stanica) (74). Mjera za titraciju izoliranog virusa – TCID₅₀ (engl. *Tissue Culture Infective Doses*, TCID - infektivna doza za staničnu kulturu) je količina virusa prisutna u staničnoj kulturi (tekućoj fazi) koja se titrira određujući najveće razrjeđenje tekuće faze koja još izaziva citopatski učinak u 50% inokuliranih staničnih kultura). Test se očitava svjetlosnim mikroskopom. Uzorak je valjan ukoliko se u najmanje 80% stanica u kulturi ne detektira neki od citopatoloških učinaka (74).

Najviše 14 dana od žetve virusa, provode se ispitivanja uzorka na:

- Hemadsorbirajuće viruse. Ispitivanje se temelji na svojstvu određenih virusa da svojim hemaglutinirajućim izdancima koji pupaju na staničnoj membrani inficiranih stanica adsorbiraju eritrocite zamorčeta. Prema Ph. Eur. ispituje se najmanje 25% kontrolnih staničnih kultura sa suspenzijom eritrocita zamorčeta (koja se najduže skladišti na 7 dana na temperaturi 2 - 8 °C). Polovica kontrolnih staničnih kultura se inkubira 30 minuta pri sobnoj temperaturi (20 - 25 °C), a druga polovica se inkubira 30 minuta pri temperaturi 2 - 8 °C. Test je negativan ukoliko se svjetlosnim mikroskopom utvrdi da se u staničnoj kulturi eritrociti nalaze slobodni u tekućoj fazi. Ukoliko testovi pokazuju da nema dokaza o prisutnosti hemadsorbirajućih virusa dalje se provode testovi na prisutnost hemaglutinirajućih virusa (74).
- Testovi staničnih kultura na prisutnost drugih stranih agensa. Provodi se na način da se tekuća faza iz radnih stanica ispita na prisutnost stranih agensa inokulacijom kontrolnih staničnih kultura. Od svake stanične kulture u kojoj se propagiraju virusi, uzima se uzorak (supernatant) od 5 mL. Inokulirane stanice se inkubiraju pri temperaturi 35° - 37°C i promatraju 14 dana. Ako proizvodnja staničnih kultura zahtjeva neku drugu temperaturu, provode se dodatni testovi na strane agense pri temperaturi koja je predviđena za uzgoj tog tipa virusa. Ako se virusi propagiraju na primarnim staničnim linijama koje su dobivene iz pročišćenih stanica pilećih embrija dodatno je potrebno napraviti i testove na prisutnost AMV-RT i ALV-a. (74).

Kontrola pilećih zametaka za umnažanje virusa

- Testovi na hemaglutinirajuće viruse. Ispitivanje se temelji na svojstvu nekih virusa da aglutiniraju eritrocite kokoši na aglutinirajuće nastavke virusa tvoreći agregate koji padaju na dno epruvete tvoreći mrežicu ili plašt. Ispituje se prisutnost hemaglutinirajućih virusa u alantoisnoj tekućini. Prema Ph. Eur. 0,25 mL alantoisne tekućine jajeta direktno se pomiješa sa kokošjim eritrocitima. Ukoliko virusa nema u alantoisnoj tekućini, eritrociti se talože na dnu epruvete u tvoreći oblik gumba.
- Test na virus ptičje leukoze. Amnitičkom tekućinom iz kontrolnih jaja (10 mL) naciepljuje se primarna stanična kultura dobivena od 5 pasaža pilećeg embrija koji je prethodno testiran na virus ptičje leukoze (74).
- Testovi na druge strane agense. 5 mL uzorka amnitičke tekućine iz kontrolnih jaja se inokulira na primarne ili diploidne stanične linije. Inokulirane stanične kulture se promatraju 14 dana, mikroskopski se analizira je li došlo do specifičnog citopatološkog učinka (npr. liza stanica, stvaranje sincicija ili vakuolizacija stanica) za specifične viruse. Uzorak se smatra ispravnim ukoliko se u 80 % inokuliranih staničnih linija ne detektira neka od citopatoloških promjena (74).

3.4.2.2 Ispitivanje prisutnosti stranih agensa (virusa) transmisijском elektrоnskom mikroskopijom

Najmanje 200 stanica iz matične banke kontinuiranih ili diploidnih staničnih linija se ispituju transmisijском elektrоnskom mikroskopijom (TEM) kako bi dokazali prisutnost mogućih onečišćenja virusnim stranim agensima. Metode uključuju tanki rez fiksiranih stanica ili supernatanta peleta i negativno bojanje kojim se određuje i kvantificira virus u staničnoj kulturi (76). Za negativno bojanje, uzorak supernatanta, ukoliko je većeg volumena (npr. 2-4 mL) prvo se podvrgava ultracentrifugiranju kako bi dobili odgovarajuće pelete koje se resuspendiraju u par mikrolitara vode. Snaga ultracentrifuge je 100 000 x g, a vrijeme ultracentrifugiranja ovisi o količini uzorka i uređaja za ultracentrifugiranje (npr. za volumen supernatanta 2-4 ml dovoljno je 50 min ultracentrifugiranja). Trajanje navedenog postupka je 1 sat do 1 sat i 30 minuta. Pripremljeni uzorak se aplicira na rešetku te se virusne čestice

fiksiraju sa 2%- i 4%-tnom otopinom glutaraldehida ili formalina. Uzorak se ispiri sa destiliranom vodom te se oboji sa 0,05 do 2%-tnim uranil acetatom, ako se radi o jednoslojnom bojanju. Ukoliko se provodi višeslojno bojenje koristi se 0,05 do 2%-tni uranil acetat, a potom 1 do 2%-tna fosfatidinska kiselina i 0,05 do 5 %-tni amonijev molbdat. Pripremljeni i obojeni uzorak se pregledava TEM-om kako bi utvrdili prisutnost virusa u uzorku. Ukoliko je virus prisutan, u TEM –u vizualizira se morfologija virusa, odnosno vizualno se određuje radi li se o virusu s lipidnom ovojnicom ili virusu bez lipidne ovojnice, tj. golom virusu. Kako bi definirali koja je vrsta virusa prisutna u uzorku pomažu nam već dostupne TEM slike negativno bojanih virusa i virusa u tankom sloju koje su dostupne kako u atlasima virusne morfologije tako i na internetskim stranicama (http://www.virology.net/Big_Virology/BVHomePage.html) (78). Kod negativnog bojenja uzorka TEM-om se određuje veličina golih virusa, a poznato je da su goli virusi podijeljeni u tri veličine: 22 nm do 35 nm (parvovirusi, enterovirusi i kalicivirusi); 40 nm do 55 nm (poliomavirusi, papilomavirusi) i 70 nm do 90 nm (reovirusi, rotavirusi i adenovirusi). Negativno bojani uzorci koji sadrže viruse s lipidnom ovojnicom (osim poksvirusa) koji formiraju dugačke sferične oblike (kao npr. ortomiksovirus, paramiksovirus i koronavirus) mogu se jasno razlučiti pomoću TEM-u, dok virusi sa lipidnom ovojnicom koje ne formiraju dugačke lance (kao npr. virus rubele, herpesvirus i retrovirusi) teže su uočljivi TEM-om. Da bi se prepoznala vrsta virusa sa lipidnom ovojnicom bitno je uočiti kakav oblik formiraju kao što su na primjer sferični (ikozaedarski) oblici, spiralni ili morfološki nepravilni oblici (kao što su npr. retrovirusi, alfavirusi i flavivirusi). Osim negativnog bojanja uzorka prije pregleda TEM-om, za stanice i tkiva koja su previše gusta da bi elektronski snop prošao kroz njih koristi se i metoda tankog reza. Uključuje koncentriranje stanica ultracentrifugom, zatim dobiveni pelet koji se fiksira glutaraldehydom kako bi stanice držao zajedno. Osim navedenog peleti se mogu fiksirati u glutaraldehydu i potom u 1% rastaljenom agaru. Tako fiksirane stanice se zatim tretiraju kao blokovi tkiva koji se režu u tankom sloju te pregledavaju TEM-om. Glavni nedostatak navedene metode je da infekcija virusom može biti žarišna te u tom slučaju moguće je propustiti područje koje je inficirano virusom. Goli virusi u tankom sloju mogu se vidjeti pojedinačno ili u nakupinama koji stvaraju oblik nalik na kristal. Iz stanice izlaze lizom, ali nisu vezani za staničnu membranu za razliku od virusa s lipidnom ovojnicom koji su vezani za staničnu membranu. Virusi s lipidnom ovojnicom

moгу probiti kroz jezgrinu mebranu u citoplazmu (npr., herpesvirus), u intracitoplazmatsku vezikulu (npr. alfavirusi i flavivirusi, citomegalovirusi i koronavirusi), ili u plazmatsku membranu (npr. herpesvirusi, virusi rubeole i virus ospica). S obzirom na navedeno trag u identifikaciji vrste virusa može se temeljiti na prepoznavanju pomoću TEM-a na koji način se virus veže sa staničnom membranom i u kojem dijelu stanice se virus nalazi. Također, u određivanju vrste virusa TEM-om treba uzeti u obzir da se većina DNA (osim poksvirusa) replicira u staničnoj jezgri, dok se većina RNA (osim influence) replicira u citoplazmi inficiranih stanica. TEM omogućava promatranje morfologije virusa te može pomoći u identifikaciji nepoznatih virusa u uzorku staničnih kultura, a najmanji broj virusa koji je moguće navedenom metodom detektirati je 10^5 do 10^6 čestica virusa po mililitru (77). Ukoliko se uoče neobična ili dvosmislena mikrobiološka zapažanja potrebno se konzultirati sa nacionalnim regulatornim tijelom i odjelom službenog laboratorija za provjeru lijekova (OMCL). TEM se koristi i za detekciju virusnih onečišćenja (endogenih retrovirusa) u staničnim supstratima. TEM je slabo osjetljiva metoda (otkriva prisutnost virusa pri većoj koncentraciji u uzorku), te su potrebni dodatni genetički testovi (47, 50, 69).

3.4.2.3 Molekularno - bioanalitičke metode za detekciju virusa

Neki životinjski virusi primjerice, goveđi poliomavirus i svinjski cirkovirusi ne mogu se razviti u ljudskom domaćinu te nisu otkriveni prethodno opisanim rutinskim ispitivanjima na prisutnost stranih agensa, a mnogi virusi se sporo umnažaju u kulturama stanica (npr. virusi hepatitisa B i C) te je njihova detekcija otežana. U takvim slučajevima potrebni su specifični testovi za detekciju poznatih virusnih onečišćenja poput metoda dokazivanja nukleinskih kiselina virusa. Nakon što je potvrđeno da banka matičnih stanica (matične sjemene stanice) i banka radnih stanica (radne sjemene stanice) ne sadrži viruse nije potrebno ponovo testirati stanice u kasnijim fazama proizvodnje.

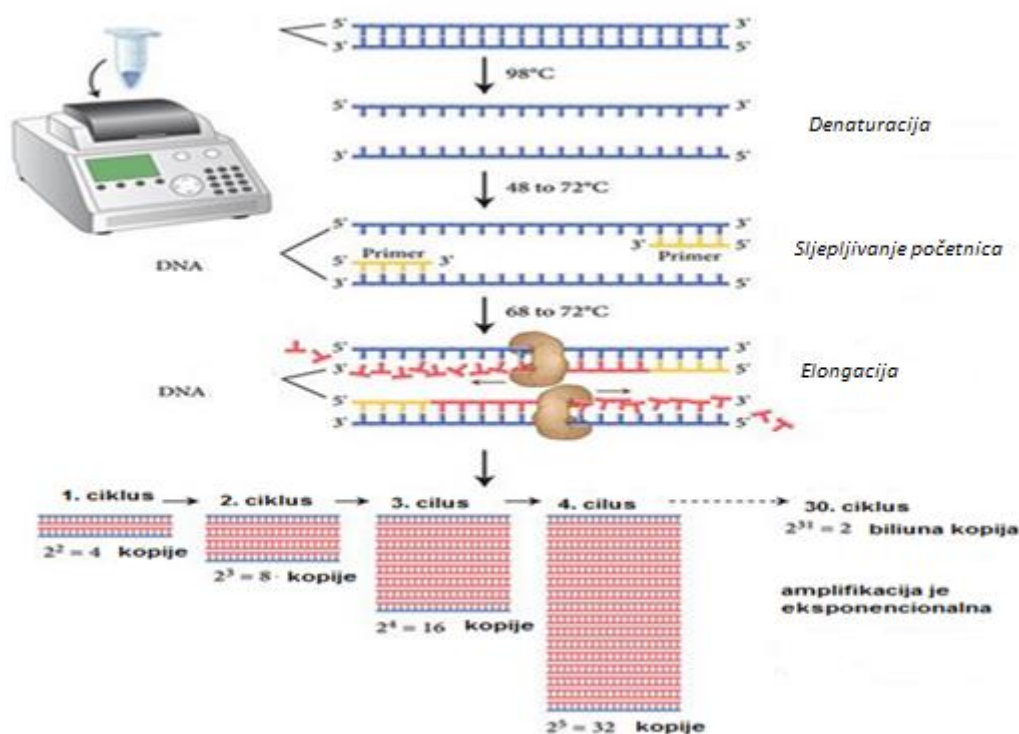
3.4.2.3.1 Lančana reakcija polimerazom (PCR)

PCR je osjetljiva molekularno-biološka metoda umnažanja nukleinske kiseline koja se izvodi u skladu sa dobrom proizvođačkom praksom. Tijekom izvođenja svi koraci postupka trebaju se izvoditi

odvojeno, od pripreme početnog uzorka odnosno izolacije nukleinskih kiselina, umnažanja DNA i konačno analize produkta PCR-a. Laboratorijsko osoblje mora biti educirano te se strogo pridržavati propisanih uputa prilikom izvođenja PCR metode kako bi se minimalizirala mogućnost onečišćenja tijekom analize (78).

Godine 1983. američki biokemičar Kary Mullis razvio je metodu lančane reakcije polimeraze, odnosno postupak kojim se u uvjetima *in vitro* umnažaju djelovi DNA kako bi se stvorila dovoljna količina te ciljane DNA koju je onda moguće detektirati. Mullis je za svoj izum 1993. godine dobio Nobelovu nagradu za kemiju. Nakon izuma, ova molekularno-biološka metoda ubrzo je bila primijenjena u znanstvenim istraživanjima, u području molekularne dijagnostike kao i u otkrivanju virusnih onečišćenja. U osnovi PCR metoda se zasniva na biokemijskoj reakciji pri kojoj se dio DNA molekule umnaža iz jedne ili malog broja kopija DNA. Prilikom uspostave PCR testa bitno je definirati: regiju za PCR i specifične početnice, osjetljivost i specifičnost testa te uvjete PCR-a. U svrhu detekcije i identifikacije virusa, potrebno je odrediti koji dijelovi ili cijeli geni virusa se umnažaju te prema njima odrediti početnice. Maksimalna osjetljivost i specifičnost PCR testa postiže se odabirom početnica. Početnice se jednostavno i točno dizajniraju pomoću kompjuterskih programa (npr. CloneManager, Oligoware 1.0) koji su namijenjeni za analizu nukleotidnih sekvenci. Nukleotidne sekvence se prikupljaju iz banke gena (EMBL i GenBank). Uloga početnica je da omeđuju DNA od interesa te omogućuju DNA polimerazi da dodaje na njih nukleotide. PCR započinje sa denaturacijom, odnosno uzorci se inkubiraju na temperaturi 90–95°C, do 1 minute pri čemu se dvolančana DNA denaturira u dvije jednolančane DNA. Zatim se DNA hibridizira s početnim oligonukleotidima (početnicama). Temperatura vezanja početnica (engl. *annealing temperature*, T_a) najvažniji je parametar koji se treba eksperimentalno odrediti u PCR reakciji, a nalazi se između 40–70°C i određuje se empirijski. Kao maksimalna početna vrijednost može se uzeti temperatura taljenja početnica (engl. *melting temperature*, T_m). Faza vezanja početnica traje 30–45 sekundi, a njezinim produžavanjem raste broj nespecifičnih produkata umnažanja. Zadnja faza je elongacija a odvija se na temperaturi koju određuje vrsta polimeraze (68°C ili 72°C) i traje oko 1 minute za umnožavanja fragmenta od 1 kilobaze (prikazno Slikom 3.) (78). Osjetljivost testa može se povećati uvođenjem

drugog ciklusa umnažanja, dvostupanjskog PCR-a (engl. *nested-PCR*), na način da se produkt prve reakcije PCR-a koristi kao kalup za drugu reakciju PCR-a, sa novim parom početnica. Kako bi odredili kojoj vrsti, tipu ili varijanti određenog virusa odgovara produkt PCR-a, produkti se sekvencioniraju, a profil slijeda nukleotida se uspoređuju sa referentnim sekvencama (78).



Slika 3. PCR metoda

S obzirom da su retrovirusi RNA virusi koji sadrže RNA genom, za njihovu detekciju potrebno je izvesti inačicu PCR-a za umnažanje RNA. Kako bi se umnožio genom RNA-virusa potrebno je prepisati RNA u cDNA reverznom transkriptazom te potom umnožiti cDNA (RT-PCR). Zbog nestabilnosti RNA molekula, uzorak treba što prije pohraniti u otopinu koja čuva integritet molekule RNA, izolirati RNA i prepisati ga u cDNA. Reakcija reverzne transkripcije izvodi se pod standardnim uvjetima, a povećanje osjetljivosti ili specifičnosti može se postići promjenom oligonukleotida, reverzne transkriptaze ili vremena trajanja reakcije. Uobičajeno se koriste nasumični heksanukleotidi

(engl. *random hexamers*), a u slučajevima negativnog rezultata ili nespecifičnih PCR produkata, umjesto heksanukleotida može se upotrijebiti početnica suprotnog polariteta (engl. *antisense*). Prema literaturnim podacima reverzne transkriptaze MuLV (engl. *murine leukemia virus*) i AMV jednako su efikasne u stvaranju cDNA. U testovima gdje se u jednoj epruveti odvijaju RT i PCR koriste se enzimi koji su i reverzne transkriptaze i polimeraze (npr. RTth), a vrsta njihove aktivnosti ovisi o temperaturi inkubacije (78).

PCR metoda može biti kvalitativna i kvantitativna. Kvalitativni PCR može biti standardni i RT-PCR. Kvantitativni PCR je Real Time PCR (u realnom vremenu), koji može biti također standardni i RT-PCR. Standardni PCR provodi se uz korištenje jednog para početnica koji omogućavaju umnažanje ciljne sekvence i služi samo za detekciju njenog prisustva ili odsustva. Varijante su višestruki PCR (engl. *multiplex-PCR*) i dvostupanjski PCR. Višestruki PCR sastoji se od više setova početnica koje omogućavaju istodobno umnažanje većeg broja različitih produkata PCR u jednoj reakciji. Jednim testom se može dobiti više rezultata i time se štedi na vremenu i sredstvima za izradu testa. Poželjno je da su produkti PCR-a različite veličine tako da ih se lako može razdvojiti elektroforezom u gelu agaroze. Višestruki PCR se koristi za detekciju i identifikaciju raznih skupina virusa kao što su HPV-i i herpesvirusi (78).

Iako se razvijaju nove i osjetljive molekularne metode sa širokim spektrom detekcije još uvijek nisu u rutinskoj uporabi, ali s obzirom da su postale široko dostupne te su validirane imati će sve veću ulogu u evaluaciji staničnih supstrata. Prilikom procjene njihove primjenjivosti treba uzeti u obzir i njihovu širinu detekcije (47, 69). Popis virusa koji se mogu detektirati *in vivo* ili *in vitro* metodama detekcije stranih agensa navedeni su u tablici 6 (79).

Tablica 6. Popis virusa koji se mogu detektirati *in vivo* ili *in vitro* metodama detekcije (preuzeto iz (79)).

<u><i>In vivo metode detekcije</i></u>
➤ odrasli miševi: virus limfocitnog koriomeningitisa (LCMV), rabdovirusi (virus bjesnoće), togavirusi
➤ okočeni miševi: koksaki A i B virusi, arbovirusi, herpes simplex virus tip 1 i tip 2, rabdovirusi (virus bjesnoće), togavirusi, virus Junín, herpes B virus

➤ oplođena kokošja jaja: herpes simplex virus tip 1 i tip 2, rabdovirusi (virus bjesnoće), herpes B, virus zaušnjaka, virus pertusisa, virus influenza, virusi parainfluenze (tip 1, tip 2 i tip 3)
➤ zamorci: paramiksovirusi, reovirusi, filovirusi
➤ kunići: virus herpesa B
<i>In vitro metode detekcije</i>
➤ diploidne stanične linije: adenovirusi, alfavirusi, koronavirusi, koksaki B virus, echo virusi, enterovirusi, flavivirusi, hepatitis A virusi, herpesvirusi, ortomiksovirusi, paramiksovirusi, poliovirusi, virus bjesnoće, reovirusi, rinovirusi, virus rubele, citomegalovirus (CMV)
➤ kontinuirane stanične linije: ljudske stanične linije (osim herpesvirusa, koronavirusai, virusa hepatitis A), virus herpes simplex, poksvirusi, virus poliomijelitisa, rota virus, vesiculovirus, filovirusi, virusi influenza, bunyavirusi, arenavirusi, rinovirusi, adenovirusi i majmunski virus herpes B
<i>Molekularno-bioanalitičke metode detekcije</i>
➤ Ispitivanje prisutnosti životinjskih virusa
- Goveđi virusi: virus goveđe virusne dijareje (BVDV), reovirus, virus bjesnoće, virus plavog jezika, goveđi adenovirus, goveđi parvovirus, goveđi respiratorni sincicijski virus (BRSV), goveđi parainfluenza tip 3, zarazni goveđi rinotraheitis
- Svinjski virusi: svinjski parvovirus, adenovirus, transmisijski gastroenteritis virus, svinjski hemaglutinirajući encefalitis virus, BVDV, reovirus

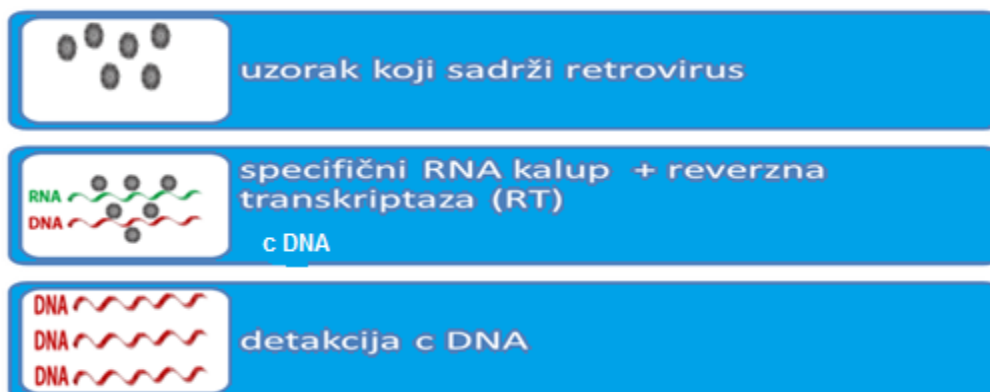
3.4.2.3.2 Metode za dokazivanje retrovirusa

Retrovirusi su jednolančani RNA virusi koji tijekom replikacije pomoću enzima obrnute (reverzne) transkriptaze (RT) svoj RNA genom kopiraju u DNA. Mogu inficirati sve rodove kralješnjaka. Kod domaćina se mogu naći u obliku endogenih virusa, kao dio staničnog genoma ili kao egzogeni virusi, neovisne čestice koje inficiraju domaćina. S obzirom da je RT dio različitih retrovirusa (ptičjeg, mišjeg ili ljudskog) mjerenjem aktivnosti enzima dokazuje se prisutnost retrovirusa u biološkom materijalu. Kvantitativna metoda kojom se testira aktivnosti RT je tzv. PERT test (engl. *Product-Enhanced Reverse Transcriptase Test*). Osim navedenog za testiranje nepoznatih retrovirusa u uzorku biološkog materijala (matičnim bankama diploidnih ili kontinuiranih staničnih linija, ovisno na kojima se virus propagira) koristi se ranije spomenuta TEM metoda, ili se provodi testiranje infektivnosti na

staničnim kulturama. TEM metoda je slabo dostupna i slabe osjetljivosti te se ne prakticira u dokazivanju prisutnosti nepoznatih retrovirusa u uzorku (80).

Test reverzne transkriptaze – PERT test

Testni uzorci stanica iz kojih se propagiraju stanične kulture za proizvodnju ispituju se na prisutnost retrovirusa. Testni uzorak je supernatant staničnih kultura (matičnih banaka primarnih, diploidnih ili kontinuiranih staničnih linija) koji se ispituje visoko osjetljivim, kvantitativnim PCR - om utemeljenim na testu RT ili PERT testom. Princip PERT testa je otkriti aktivnost RT koja je sastavni dio retrovirusa. Test se temelji na sposobnosti RT da prepíše poznati RNA kalup u molekulu komplementarne DNA (cDNA) koja se nakon toga umnoži PCR-om (slika 4) (81).



Slika 4. Princip PERT testa

Rezultate navedenih visoko osjetljivih testova treba tumačiti s oprezom. Naime, aktivnost RT nije specifična samo za infektivne retroviruse već može biti potaknuta prisustvom defektnih čestica sličnih retrovirusima koji ne kodiraju za kompletni infektivni genom virusa ili aktivnost drugih prisutnih polimeraza može dati prividnu aktivnost RT. Zbog mogućeg lažnog pozitivnog rezultata PERT- testa zahtjevaju se daljne obrade uzorka, kao što je provođenje testa infektivnosti, odnosno niže opisani testovi (80, 81).

➤ PCR i specifični *in vitro* testovi za dokazivanje retrovirusa

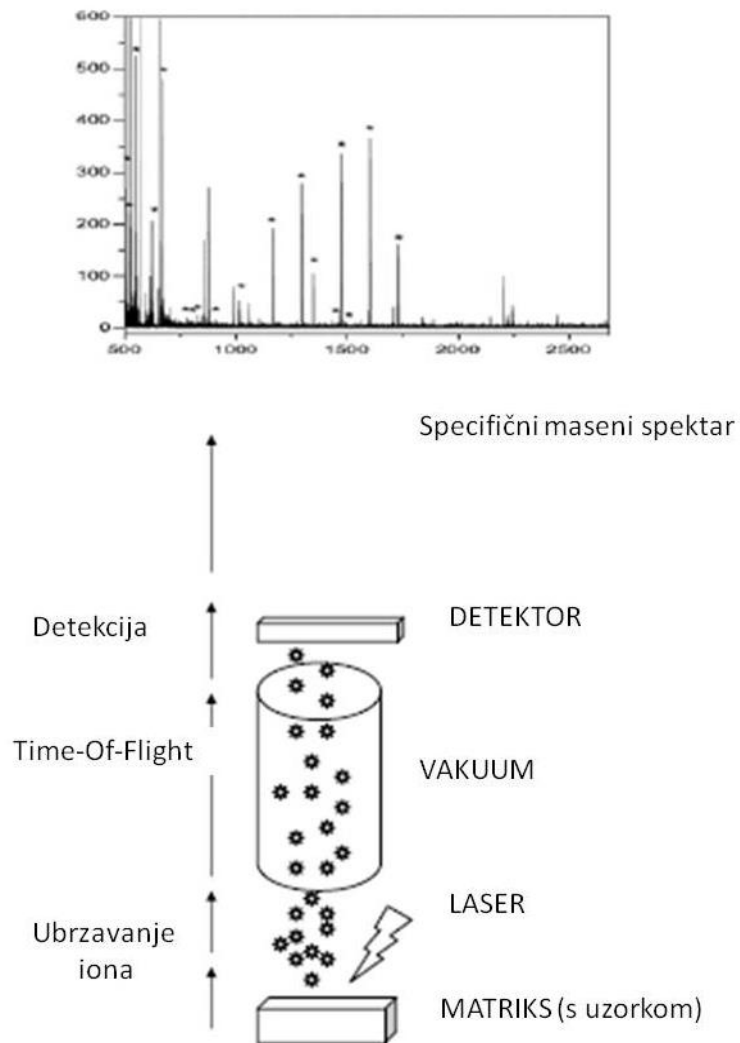
Ako PERT test daje nejasne rezultate, u probiru staničnih supstrata za tu vrstu specifičnih retrovirusa, mogu se koristiti molekularne metode (PCR) kao i testovi u kojima se primjenjuju za viruse specifična protutijela (imunofluorescencija, imunoenzimski test-ELISA), ili druge specifične metode otkrivanja virusa. Molekularne metode koje se temelje na PCR tehnici, mogu se također koristiti za kvantificiranje sličnih retrovirusa dobivenih iz proizvodne žetve. Za takve metode potrebno je savjetovanje s nacionalnim regulatornim tijelom ili odjelom službenog laboratorija za provjeru lijekova o njihovoj prihvatljivosti (80). PCR metodologija i njezine modifikacije detaljnije su opisane u testovima za dokazivanje određenih vrsta virusa (str. 53).

➤ Test infektivnosti retrovirusa

Kada se u uzorku primarne stanične kulture TEM-om ili PERT testom utvrdi prisutnost retrovirusa, potrebno je dodatno provesti pokuse infektivnosti na ljudskim stanicama kako bi se procijenilo je li aktivnost RT povezana s repliciranjem infektivnih retrovirusnih čestica. Pritom se koriste stanične kulture (*kao npr. diploidne stanične kulture, MRC-5; kontinuirane stanične kulture, Vero*) u kojima se može umnažati što širi spektar retrovirusa.

3.4.2.3.3 Mogućnosti primjene MALDI TOF masene spektrometrije u detekciji virusa

Masenom spektrometrijom mogu se identificirati različite tvari razdvajanjem njihovih iona pomoću masenog spektrometra na temelju specifičnog omjera mase i naboja razdvojenih iona. Pritom svaka tvar ima jedinstveni obrazac masene fragmentacije tj. maseni spektar. Stoga se ova metodologija može primijeniti ne samo za analizu različitih kemijskih spojeva nego i za identifikaciju bioloških makromolekula kao što su DNA, RNA, proteini i ugljikohidrati, a time i za identifikaciju mikroba uključujući i viruse. Međutim, biološke makromolekule su termički nestabilne i teško se prevode u plinovito stanje što otežava analizu masenom spektrometrijom. Upravo je zbog toga razvijena metoda MALDI-TOF (engl. *Matrix-Assisted Laser Desorption-Ionisation Time-of-Flight*) masene spektrometrije. Metoda se temelji na nekoliko osnovnih koraka prikazanih na slici 5.



Slika 5. MALDI – TOF metoda

- Uzorak se ravnomjerno raspoređuje unutar matriksa na pločici, posuši se u vakuumu dok se matriks ne rekristalizira
- Pločica s uzorkom se izlaže pulsu laserske zrake određene valne duljine čime se postiže desorpcija i ionizacija uzorka
- Istovremeno s pulsevima laserske zrake proizvodi se električno polje kojim se ioni uzorka ubrzavaju

- d) Ioni prolaze kroz vakuum do detektora bez djelovanja električnog polja tijekom određenog vremena (engl. *Time of Flight*, TOF) pri čemu brzina, odnosno vrijeme njihovog putovanja ovisi o konstantnom omjeru mase i naboja, što se bilježi na detektoru i očitava se kao maseni spektar jedinstven za uzorak.

Izvorno je MALDI razvijen za analizu polipeptida i proteina općenito, pa je kasnije primijenjen u identifikaciji proteinskog profila mikroba bez obzira na njihovu vrstu i skupinu. Utvrđeni proteinski spektri se uspoređuju sa spektrima dostupnim u bazama podataka pri čemu se bez korištenja specifičnih seruma ili molekulskih biljega za masu proteina može otkriti njihov sastav i masa (82-84). MALDI-TOF MS je 1990-tih korišten za identifikaciju bakterija u različitim istraživanjima, a kao rutinska metoda u bakteriologiji je uveden 2004. godine kada je osnovana baza podataka za identifikaciju (85).

Do sada je objavljen veći broj radova o primjeni MALDI-TOF MS u kliničkoj mikrobiološkoj dijagnostici, odnosno u istraživanjima vezanim za bakteriologiju i mikologiju. Međutim, vrlo je mali broj publikacija o primjeni ove metode u virološkoj dijagnostici, odnosno u istraživanjima koja se bave virusima, za što postoji nekoliko mogućih razloga; a) velika molekulska masa viralnih proteina (>20 KDa), dok se mikrobiološka dijagnostika bazira na proteinima male molekulske mase (2-20 KDa) pri čemu većina detektiranih pikova odgovara ribosomskim proteinima mikroba; b) mnogi medicinski značajni virusi se uzgajaju u kulturi stanica te je izdvajanje viralnih proteina otežano zbog ostataka staničnog suspstrata, za razliku od izdvajanja primjerice bakterijskih proteina za koje već postoje standardizirani protokoli; c) jedan od razloga je i postojanje standardiziranih protokola molekularno-bioloških i seroloških metoda u virološkoj dijagnostici koje su relativno brze i zadovoljavajuće; d) visoku cijenu sustava MALDI-TOF MS i edukaciju stručnjaka za interpretaciju rezultata također se treba uzeti u obzir (83, 86).

Usprkos navedenim razlozima postoji nekoliko istraživanja koja govore u prilog korisne primjene MALDI-TOF MS u kombinaciji s različitim pristupima pripreme uzorka i to u dijagnostici virusa influence, enterovirusa, humanog papiloma virusa-HPV i herpesvirusa i virusa hepatitisa (83).

Zahvaljujući mogućnosti preslagivanja segmentiranog genoma virusa influence i prijenosu između različitih vrsta domaćina, ovaj virus izaziva epidemije i pandemije što uvjetuje potrebu razvoja brze i učinkovite dijagnostičke metode. Detekcija virusa influence provodi se PCR-vezujućim metodama (rRT-PCR) i serološkim metodama, međutim zbog rekombinacije tj. preslagivanja virusnog genoma može se dogoditi da se početnice koje se koriste u PCR-u ne uspijevaju vezati za ciljne sekvence što zahtjeva njihovo redizajniranje. Chou i sur. (2011) su primijenili vezanje virusnih hemaglutinina (HA) H5N2 i H5N1 virusa ptičje influence iz lizata alantoinne tekućine pomoću specifičnih protutijela konjugiranih na magnetske nanočestice te izravnu analizu takvog uzorka pomoću MALDI-TOF MS. U ovom slučaju MALDI-TOF MS se pokazala kao brza i pouzdana metoda u detekciji antigenih podtipova ptičje influence pri čemu nije došlo do križne reaktivnosti što je od velikog značaja u dijagnostici i epidemiologiji virusa influence (87). Calderaro i sur. (2014) su uspješno primijenili MALDI-TOF MS u detekciji poliovirusa serotipa 1,2 i 3 u kliničkim uzorcima (likvor, stolica i bris grla) pri čemu se pokazalo da je VP4 protein kapside specifični proteinski biomarker u razlikovanju ta tri serotipa poliovirusa (86). Nedavno je razvijena visoko osjetljiva automatizirana metoda za detekciju 14 genotipova HPV-a bazirana na kombinaciji MALDI-TOF-MS platforme i PCR-a (*Mass Array* tehnika) koja ne pokazuje križnu reaktivnost s drugim tipovima HPV-a. Metodu je moguće nadograditi uvođenjem novih početnica u tzv. koktel početnica koji se koristi u PCR-*Mass array*-u (88). Slična platforma koja kombinira *Mass Array* sustav analize nukleinskih kiselina MALDI-TOF MS tehnologijom razvija se i u dijagnostici herpesvirusa i virusa hepatitisa B i C te u detekciji rezistencije na ganciklovir (82, 89, 90).

Istraživanja mogućnosti primjene MALDI-TOF MS platforme u detekciji virusa pokazuju određene prednosti i nedostatke u odnosu na postojeće ranije opisane metode. Prema dosadašnjim istraživanjima može se zaključiti da će MALDI-TOF MS platforma naći primjenu u detekciji virusa u kliničkim uzorcima, detekciji mutacija virusa i screeningu različitih subtipova virusa, epidemiologiji virusnih infekcija i detekciji rezistencije na antivirusne lijekove. Ono što je zasigurno problematično kod ove metodologije je priprema uzorka, odnosno primjena kombiniranih metoda koje su za sada izuzetno skupe te nedostatak baza masenih spektara. S obzirom na široke mogućnosti detekcije MALDI-TOF

MS platforme, osjetljivosti, točnosti, brzini i mogućnosti automatizacije procesa ova metoda bi mogla zamijeniti postojeće metode u virološkoj dijagnostici.

3.5 Povijesni primjeri virusnih onečišćenja u cjepivima

Prva značajnija virusna onečišćenja u postupku proizvodnje cjepiva otkrivena su 1950. godine. Otkriveno je onečišćenje primarnih staničnih kultura bubrega majmuna koji su se tada koristile za proizvodnju virusnih cjepiva. Pronađen je pjenasti virus (*lat. spuma retroviridae*) koji je na kulturama stanica uzrokovao sincicijski učinak sličan pjenu što dovodi do propadanja stanica. Klinički je dokazano da pjenasti virus ne uzrokuje nikakve kliničke simptome *in vivo* dok kod zaraženih životinja uzrokuje doživotnu infekciju (91). Iste godine u stanicama jajnika kineskog hrčka (engl. *Chinese hamster ovary*, CHO), koje su se također koristile za proizvodnju virusnih cjepiva, detektirano je onečišćenje kalicivirusom. Kalicivirus, početno je izoliran iz CHO stanica, pokazujući očigledne citopatološke učinke. Elektronskom mikroskopijom staničnog lizata otkriveni su virioni tipične morfologije kalicirusa. Kod ljudi, kalicivirusi predstavljaju glavni uzrok gastroenteritisa, dok životinjski kalicivirusi mogu uzrokovati vezikularne lezije kod svinja i lavova, respiratorne bolesti i konjuktivitis kod mačaka te teške hemoragijske bolesti jetre kod kunića. Za ljudske kaliciviruse ne postoji sustav stanične kulture u kojemu se mogu lako propagirati i uzrokovati citopatološki učinak kako bi ih se moglo detektirati. Elektronskom mikroskopijom vidljivo je da neke vrste kalicirusa pokazuju tipične površinske depresije stanica u obliku šalice koje su karakteristične za "ćelavu" morfologiju po čemu je obitelj virusa dobila i ime (*lat. calix*, šalice) (92).

1960.-ih godina u živim atenuiranim virusnim cjepivima protiv žute groznice koja su propagirana u pilećim embrijima pronađen je virus ptičje leukoze (uzrokuje rak kod pilića). Međutim, virus ptičje leukoze se ne umnaža u stanicama sisavaca. Ljudi koji su cijepljeni navedenim cjepivom nisu bili u opasnosti od zaraze uzrokovane virusom ptičje leukoze.(93). Jedan od najčešćih stranih agensa koji je otkriven u živim atenuiranim cjepivima je virus goveđe virusne dijareje (BVDV tip 1 i BVDV tip 2) jer se za uzgoj stanica koristi fetalni teleći serum. (94) U dijagnostičkim laboratorijima bioindustrije u fetalnom telećem serumu koji je naručen iz Tajlanda osim BVDV tipa 1 i BVDV tip 2 otkriven je i novi virus tip 3 (95).

U atenuiranim i inaktiviranim cjepivima protiv poliomijelitisa farmaceutske tvrtke Merck 1960. godine otkrivena su onečišćenja virusom majmuna (engl. *Simian virus 40*, SV40). Virus SV 40 ispitan je na okoćenim zamorcima kod kojih je pokazao onkogeno svojstvo. Međutim, ne postoji dokaz o uzročnoj vezi između cjepiva koje je onečišćeno s virusom SV 40 i raka kod ljudi. Posljedično SZO je uz pomoć stručnjaka iz različitih zemalja (SAD, bivši SSSR, Velika Britanija i Kanada) definirala smjernice za proizvodnju i ispitivanje oralnog cjepiva protiv poliomijelitisa. Ta je ekspertna skupina u studenom 1960. donijela odluku da se sve sjemene serije i proizvodne mase cjepiva protiv poliomijelitisa moraju ispitati na prisutnost SV-40 (96).

Svinjski cirkovirus prvi put je izoliran i opisan 1974. godine kao onečišćenje u obliku parvovirusne i pikornavirusne čestice u kulturi svinjske bubrežne stanične linije, PK-15 (97). Svinjski cirkovirus je mali ikozahedralni virus bez ovojnice koji sadržava jednolančani kružni DNA genom od oko 1,76 kilobaza te je klasificiran u porodicu cirkovirusa (*lat. Circoviridae*). 1985. godine objavljena je potpuna nukleotidna sekvenca (1759 nt) kružnog genoma PCV 1 virusa (98, 99). 2010. godine objavljeno je da su u dvije proizvedene serije Rotarix® cjepiva, proizvođača GlaxoSmithKline (GSK), koji ima najveću primjenu kod djece, istraživači pod vodstvom dr. Delwart (Blood Systems Research Institute i University of California, San Francisco) otkrili prisutnost DNA fragmenta svinjskog cirkovirusa-1 (PCV-1) (100). Rotarix je cjepivo koje se primjenjuje za sprečavanje dijareje uzrokovane infekcijom rotavirusom. Odobreno je 2008. u SAD-u a primjenjuje se u još 114 zemalja, uključujući zemlje članice EU. Oko 30 milijuna djece diljem svijeta (većinom u Latinskoj Americi) te otprilike 1 milijun djece u SAD-u cijepljeni su Rotarix cjepivom. FDA je s ciljem odobravanja lijekova ispitivao čistoću osam živih virusnih cjepiva (cjepiva protiv dječje paralize, rubele, morbila, žute groznice, humanog herpes, varičele, rotavirusa (Rotarix i Rotateq) i polivalentnog cjepiva protiv velikih boginja, zaušnjaka i rubeole. U postupku odobravanja cjepiva Rotarix i sam proizvođač GSK, kao odgovor na regulatorne zahtjeve, potvrdio je prisutnost SCV1 (Semium Cirka Virus 1) u banci stanica i sjemennoj seriji iz koje se proizvodilo cjepivo. Međutim, SCV1 se smatra bezopasnim za ljude jer ne uzrokuje bolesti ni u svom prirodnom domaćinu (svinji) te se nisu očekivale prijave ozbiljnih nuspojava koje bi uzrokovao SCV1 virus kod primjene Rotarix cjepiva. Zdravstveni radnici su

naglasili da je potrebno uzeti omjer rizika i koristi kod primjene Rotarix cjepiva u zemljama u kojima je učestalost zaraze rotavirusom česta, a što je slučaj u nerazvijenim dijelovima svijeta u kojima je zabilježena velika smrtnost djece, više od 500.000 djece, uzrokovana rotavirusom (101).

3.6 Različitosti u propisima, monografijama i smjernicama

Sve navedene znanstveno-regulatorne smjernice u dijelu 3.3. ovog specijalističkog rada namijenjene proizvođačima i nacionalnim regulatornim tijelima se prema potrebi revidiraju kako bi proizvođače savjetovali o odabiru, karakterizaciji i održavanju staničnih supstrata koji se koriste za proizvodnju cjepiva (56).

Unatoč harmonizaciji propisa i smjernica za metode detekcije predviđenih stranih agensa u proizvodnji cjepiva, postoje manje razlike u regionalnim zahtjevima te u monografijama i smjernicama koje predstavljaju izazove za proizvođače koji proizvode cjepivo za globalno tržište. Kao što je već spomenuto ICH je uspio uspostaviti usklađenost u propisima za metode detekcije stranih agensa i odabira staničnih supstrata. Međutim, postoje određene razlike u zahtjevima različitih regija u pogledu postupka ispitivanja stranih agensa, fazi testiranja i prirodi testiranja. Primjer je *in vitro* metoda detekcije stranih agensa koja koristi indikatorske stanice. Takvi testovi se općenito provode u fazi glavne žetve stanica prije koraka pročišćavanja ili na staničnim supstratima (staničnom lizatu ili živim stanicama) (72). Tablica 7 prikazuje razlike u potrebi za ispitivanjem, vrsti i broju indikatorskih stanica, vrijeme inkubacije i korištene metode (primjerice, zahtjev za uzgoj), vremensko promatranje citopatološkog učinka na indikatorskim stanicama (nakon 24 ili 28 dana) ili hemadsorpcije ili hemaglutinacije kao pokazatelja pozitivnog ili negativnog testiranja na predviđene strane agense (56). U Tablici 7 prikazane su razlike u postupcima ispitivanja virusnih onečišćenja *in vitro* i *in vivo* u različitim smjernicama i farmakopejskim propisima. (71).

Tablica 7. Razlike u propisima monografija i smjernicama za metode detekcije stranih agensa u uvjetima *in vivo* i *in vitro* (71).

	SZO, TRS 978 prilog 3	FDA smjernica, 2010	Ph. Eur. poglavlje 5.2.3	Ph. Eur. poglavlje 2.6.16
<i>In vitro testovi</i>				
Testni uzorak	10 ⁷ živih stanica ili staničnih lizata	Stanični lizat koji je ekvivalent 10 ⁷ stanica (pri ispitivanju banke stanica) 500 doza ili 50 mL ovisno što je prikladnije (virusna sjemena serija i virusna žetva)	Test na hemaglutinirajuće agense : - supernatant stanične kulture - stanica ili stanični dijelovi	500 doza ili 50 mL, ovisno što je prikladnije (virusna sjemena serija i virusna žetva)
Indikatorske stanične kulture	<u>Najmanje 2 tipa staničnih kultura</u> - ista vrsta i tip staničnih linija - humane diploidne stanične linije <i>- u nekim zemljama, odnosno u kulturama trećeg svijeta, različite vrste staničnih linija</i>	<u>3 tipa staničnih kultura</u> - ista vrsta i tip staničnih linija - humane diploidne stanične linije - kultura Vero stanica	<u>Najmanje 2 tipa staničnih kultura</u> Kao što je navedeno u dijelu Ph.Eur. 2.6.16. test na hemadsorbirajuće viruse i testovi na strane agense u supernatantu stanične kulture te ponovna kultivacija na humanim diploidnim staničnim linijama i kulturi Vero stanica.	<u>Najmanje 2 tipa staničnih kultura</u> -kultura Vero stanica - humane stanične linije -ukoliko se virus uzgaja na tipu stanične kulture koje nisu ljudskog ili majmuskog podrijetla(npr. kultura CEC stanica, kultura MDCK stanica ili kultura EB66® stanica) i one se koriste kao indikatorske stanične kulture.
Vrijeme inkubacije	Najmanje 14 dana	Najmanje 14 dana te ponovna kultivacija (dodatnih 14 dana)	Najmanje 14 dana	Stanice se inkubiraju na 36±1°C i promatraju 14 dana
<i>In vivo testovi na strane agense u odraslim miševima</i>				
Testni uzorak	10 ⁷ vijabilnih stanica ili staničnih lizata	10 ⁷ vijabilnih stanica/mL ili ekvivalent staničnih lizata	10 ⁷ vijabilnih stanica	Virusne sjemene serije
Životinje	10 odraslih miševa, težine 15-20 g	20 odraslih miševa, težine 15-20 g	10 odraslih miševa, težine 15-20 g	10 odraslih miševa, težine 15-20 g

Put primjene	<i>ic.</i> 0,03 mL (u nekim zemljama) <i>i.c.</i> 10 ⁶ stanica/mišu <i>ukoliko se ispituje prisutnost LCMV ic. 10⁶ stanica/10 miševa</i>	<i>ip.</i> 5 mL <i>ic.</i> 0,03 mL	<i>im.</i> (nije propisana količina) <i>ic.</i> 10 ⁶ stanica/mišu <i>ukoliko se ispituje prisutnost LCMV ic. 10⁶ stanica/10 miševa</i>	<i>ip.</i> 0,5 mL <i>ic.</i> 0,03 mL
Vrijeme promatranja	4 tjedna ili 21 dan	21 dan	4 tjedna	21 dan
<i>In vivo testovi na strane agense alantoisnoj šupljini</i>				
Testni uzorak	10 ⁶ vijabilnih stanica ili stanični lizati	10 ⁷ vijabilnih stanica/ mL ili ekvivalent staničnih lizata 100 doza ili 10 mL ovisno što je prikladnije	10 ⁶ vijabilnih stanica po jaju	100 doza ili 10 mL ovisno što je prikladnije (virusno sjeme propagirano i virusna žetva na primarnim staničnim kulturama)
Životinja	10 jaja, starosti 9-11 dana	10 jaja, starosti 10-11 dana	10 jaja, starosti 9-11 dana	20 ili više jaja, starosti 9-11 dana
Volumen po alantoisnoj šupljini	0,5 mL	0,5 mL	/	0,5 mL
Vrijeme promatranja	najmanje 5 dana	3 dana i 3 dana nakon pasažiranja	najmanje 5 dana	7 dana

ip.- intraperitonealno

ic. - intracerebralno

im. - intramuskularno

3.7 Prednosti i nedostaci metoda za određivanje stranih agensa u virusnim cjepivima

Usporedba prednosti i nedostataka metoda koje se primjenjuju za ispitivanje virusnih onečišćenja u cjepivima u uvjetima *in vivo* i *in vitro* prikazana je u tablici 8 (79).

Tablica 8. Prednosti i nedostaci metoda za određivanje stranih agensa u virusnim cjepivima (prilagođeno iz (79)).

<i>In vivo</i> metode detekcije stranih agensa
<p>Prednosti :</p> <ul style="list-style-type: none"> - moguće je detektirati prisutnost različitih vrsta virusa patogenih za ljude (vidi tablicu 6) u jednom testu - dovoljna je mala koncentracija virusa u uzorku da bi se razmnožili u domaćinu i samim tim omogućila detekcija prisutnosti virusa u uzorku. Navedeno doprinosi osjetljivosti same metode jer se navedenom metodom mogu detektirati virusi pri niskoj koncentraciji u ispitivanom uzorku pod uvjetom da su patogeni za pokusne životinju (<i>miševe, okoćene miševe, zamorce i kuniće</i>)
<p>Nedostaci:</p> <ul style="list-style-type: none"> - ograničen je broj vrsta virusa koji se mogu detektirati <i>in vivo</i> metodom s obzirom da se neki patogeni virusi za ljude ne mogu razmnožavati u životinjama - prilikom ispitivanja virusne sjemene serije na prisutnost stranih agensa (virusa) potrebna je neutralizacija virusne sjemene serije čime se smanjuje osjetljivost metode jer je moguće inaktivirati neke od stranih agensa (virusa) - sredstva koje se koriste za provođenje <i>in vivo</i> metode mogu biti otrovna te utjecati na rezultate samog ispitivanja uzrokujući bolest ili smrtnost pokusnih životinja - osjetljivost testova nije opće definirana
<i>In vitro</i> metode detekcije stranih agensa
<p>Prednosti :</p> <ul style="list-style-type: none"> - moguće je u jednom testu detektirati prisutnost različitih vrsta virusa patogenih za ljude (vidi tablicu 6) - dovoljna je mala koncentracija virusa da bi se razmnožili u odabranim staničnim linijama za <i>in vitro</i> ispitivanje, što doprinosi osjetljivosti metode jer se strani agens (virus) može detektirati pri niskim koncentracijama u ispitivanom uzorku
<p>Nedostaci:</p> <ul style="list-style-type: none"> - nemogućnost detekcije prisutnosti virusa u uzorku koji na staničnim linijama ne uzrokuju pojavu CPE učinka. Ako se virusi mogu replicirati u staničnoj kulturi, ali ne uzrokuju CPE učinak također ih je nemoguće detektirati te dodatno odrediti radi li se o hemaglutinirajućim ili hemaadsorbitirajućim agensima (virusima) - u nekim slučajevima virusna cjepiva moraju biti neutralizirana i visoki titar seruma možda neće biti dovoljan za određivanje prisutnosti stranih agensa (virusa) odnosno moguće će dati lažno pozitivne rezultate na prisutnost virusa - materijali koji se koriste za testiranje mogu ometati detekciju virusa (smanjiti osjetljivost testa) - testiranje prisutnosti svih retrovirusa na staničnom kulturama nije moguće jer se neki retrovirusi ne mogu razmnožavati <i>in vitro</i> u staničnim kulturama ili ne uzrokuju CPE - osjetljivost testova nije opće definirana
TEM
<p>Prednosti:</p> <ul style="list-style-type: none"> - mogućnost detekcije različitih vrsta virusa, moguće je detektirati i nepoznate i neočekivane strane agense (viruse) u uzorku - vizualizacijom virusa određuje se vrsta virusa
<p>Nedostaci:</p> <ul style="list-style-type: none"> - niska osjetljivost - prilikom pregleda uzorka TEM-om potrebno je stručno i obučeno osoblje - kvalitativno određivanje virusa dalje zahtijeva procjenu identiteta i funkcionalnosti virusnih čestica

RT-PCR test na retrovire
<p>Prednosti:</p> <ul style="list-style-type: none"> - vrlo osjetljiva metoda kojom se određuje prisutnost poznatih, odnosno pretpostavljeno prisutnih virusa u uzorku pri njihovoj niskoj koncentraciji - mogućnost detekcije svih retrovirusa (infektivnih i neinfektivnih) - osim kvalitativnog određivanja virusa, određuju se i kvantitativna prisutnost virusa
<p>nedostaci:</p> <ul style="list-style-type: none"> - nakon pozitivnih rezultata na prisutnost virusa u uzorku, potrebno je daljnja obrada kako bi odredili vrstu, tip virusa (sekvencioniranje) i njegovu infektivnost <i>in vivo</i> i <i>in vitro</i> - potreban je dodatni oprez pri interpretaciji rezultata s obzirom da uzorak za analizu je najčešće supernatant stanične kulture te se u njemu nalaze lizirane stanice iz kojih potječu razne stanične polimeraze i nuklearni enzimi koji mogu imati sličnu aktivnost RT i utjecati na način da su rezultati testa lažno pozitivni. S obzirom na navedeno, jako je bitno točno odrediti i evaluirati od kuda potječe signal koji se detektira navedenim testom te odrediti najniži signal pri kojemu se smatra da je test pozitivan.
Molekularno-biološke metode temeljene na PCR-u
<p>Prednosti:</p> <ul style="list-style-type: none"> - visoka osjetljivost, brzina i otkrivanje identiteta virusa - metoda PCR se može proširiti za otkrivanje novih virusa
<p>Nedostaci:</p> <ul style="list-style-type: none"> - ispituju se individualne vrste i tipovi virusa - testovi se moraju ažurirati odnosno proširiti na detekciju prisutnosti novootkrivenih virusa

3.8 Mogućnosti implementacije „3RS“ protokola u određivanju virusnih onečišćenja u cjepivima

Regulatorno se pruža podrška za primjenu alternativnih testiranja umjesto *in vivo* metoda za ispitivanje prisutnosti stranih agensa. Niz europskih zakona koji reguliraju pokuse na životinjama, (*Konvencija za zaštitu kralježnjaka koji se koriste za eksperimentalne i druge znanstvene svrhe* (Ugovor 123) od Vijeća Europe i Direktive 86/609/EEZ Europske unije) sveukupno se kreću prema zamjeni, smanjenju i usavršavanju pokusa na životinjama ili "3RS" (engl. *Replacement, Reduction and Refinement*). Primjerice u članku 7 (točka 2) Direktive navodi se, ukoliko je moguće, smanjenje uporabe životinja tj. pokusne životinje se trebaju koristiti jedino kada ne postoji druga znanstveno utemeljena i zadovoljavajuća metoda (78). Zatim, Članak 7 (točka 3) ističe da je potrebno izabrati pokuse koji koriste minimalan broj životinja te one pokuse koji uzrokuju najmanje boli, patnje, nevolje i trajnu štetu, a koji će opet dati zadovoljavajuće rezultate, te (točka 4) svi pokusi moraju biti dizajnirani na način da se izbjegne tjeskoba i nepotrebna bol i patnja životinja (78).

Članak 23. Direktive 86/609/EEZ također navodi kako EK i države članice trebaju pokrenuti 3RS ispitivanja. U Monografiji "Cjepiva za veterinarsku uporabu" Ph. Eur.-e navodi se, u skladu sa Općim uputama, da se alternativne metode ispitivanja mogu koristiti za dokaz usklađenosti s monografijom te potiču testove koji dovode do zamjene ili koji dovode do smanjenja korištenja životinja ili smanjenja patnje životinja (78).

Korištenje alternativnih metoda analize može biti prihvaćeno ukoliko omogućuje donošenje nedvosmislene odluke i mora biti u skladu s odobrenim metodama u Ph. Eur. U poglavlju 2.6.24 "Virusnih cjepiva za ptice: Testovi za strane agense u sjemenim serijama " i 2.6.25 "Virusna cjepiva za ptice: Testovi za strane agense u serijama gotovih proizvoda", kao metodu određivanja stranih agensa-virusa navode detekciju virusne nukleinske kiseline (engl. *Nucleic Acid Testing*, NAT). Tehnike umnažanja nukleinskih kiselina (2.6.21) mogu specifično detektirati puno agenasa. Iz navedenog je vidljivo da se podupire korištenje NAT za testiranje stranih agensa u cjepivima (9, 78).

4 RASPRAVA

Cjepiva imaju ključnu ulogu u sprječavanju zaraznih bolesti u ljudi i u životinja te je važno osigurati njihovu djelotvornost, kvalitetu i sigurnost primjene. U razvoju i proizvodnji cjepiva koriste se biološki materijali životinjskog ili ljudskog podrijetla što može dovesti do onečišćenja cjepiva stranim agensima (virusom). Onečišćenje se može javiti u svim koracima proizvodnje od samog početnog materijala (matična sjemena serija ili radna sjemena serija) do gotovog proizvoda – cjepiva (60). Sve veće znanje o različitim vrstama virusa kao stranim agensima u cjepivu i brzi razvoj naprednih molekularno-bioloških tehnika koje omogućuju otkrivanje do sada nepoznatih virusa (bez potrebe za njihovom izolacijom i uzgojem), predstavlja veliki izazov za proizvođače i regulatorna tijela. Za regulatorna tijela izazovi se odnose na osmišljavanje protokola i postavljanje smjernica kako za testiranje prisutnosti stranih agensa tako i za postupanje u slučaju potvrde njihove prisutnosti u proizvodnom postupku ili gotovom proizvodu. Postupci za prevenciju virusnih onečišćenja tijekom proizvodnje cjepiva propisani su znanstveno-regulatornim smjernica koje su dostupne na stranicama EMA-e, SZO-a te u farmakopejskim monografijama. Vodeću ulogu u globalnom procesu savjetovanja u stvaranju standarda za ocjenu sigurnosti i kvalitete cjepiva i drugih bioloških lijekova proizvedenih iz staničnih supstrata životinjskog podrijetla preuzela je SZO. Na stranicama SZO dostupan je dokument *WHO Technical Report Series, No. 878 "Recommendations for the evaluation of animal cell cultures as substrates for the manufacture of biological medicinal products and for the characterization of cell banks"* koji se ciljano bavi virusnim onečišćenjima u proizvodnji cjepiva i drugih bioloških proizvoda. Taj dokument daje preporuku proizvođačima i nacionalnim regulatornim tijelima o procjeni staničnih kultura životinjskog podrijetla kao supstrata za proizvodnju bioloških lijekova i za karakterizaciju banaka stanica. Osim navedenog na stranicama SZO dostupna je serija tehničkih izvješća (engl. *Technical Report Series, TRS*) za pojedinačna cjepiva kojima je cilj pružiti proizvođačima i nacionalnim regulatornim tijelima smjernice na koji način prilikom proizvodnje i kontrole kvalitete virusnih cjepiva/bioloških proizvoda osigurati njihovu kvalitetu, mikrobiološku čistoću, odnosno zdravstvenu ispravnost. Metode detekcije stranih agensa u svim propisima, znanstveno-regulatornim smjernicama i monografijama namijenjenim proizvođačima i nacionalnim

regulatornim tijelima opisuju i predlažu metode detekcije stranih agensa u uvjetima *in vivo* i *in vitro*. Konvencionalne metode uključuju *in vitro* testove na staničnim kulturama i *in vivo* testove na miševima, zamorcima, kunićima i pilećim embrijima.

Zadnjih 20 godina razvile su se nove molekularno-biološke metode temeljene na PCR tehnici što predstavlja alternativu dosadašnjim konvencionalnim postupcima testiranja virusa kao stranih agensa tijekom proizvodnje cjepiva. Niz europskih zakona koji reguliraju pokuse na životinjama usmjereni su prema uvođenju tzv. 3RS protokola kako bi se smanjila ili čak potpuno zamjenila primjena laboratorijskih životinja. Metode u kojima se koriste žive životinje imaju nekoliko nedostataka; potrebno je duže vrijeme testiranja kako bi se detektirali strani agensi u cjepivima; postoji mogućnost da životinja koja je zaražena određenim virusom ne stvara humoralni imunosni odgovor; a neki virusi koji su patogeni za ljude ne mogu se razmnožavati u životinjama. Kako bi se nadišla ova ograničenja, kulture stanica ljudskog ili životinjskog podrijetla predstavljaju model koji može u velikoj mjeri zamijeniti upotrebu pokusnih životinja. Primjena molekularno-bioloških metoda u detekciji virusa, odnosno primjena metagenomskih analiza, omogućuje otkrivanje novih DNA i RNA virusa, bez zahtjeva za njihovom izolacijom i uzgojem u svrhu upoznavanja njihovih bioloških svojstava. Naime, detekcijom genoma virusa moguće je predvidjeti njihova biološka svojstva, sintezu specifičnih proteina koji su odgovorni za vezanje na stanicu domaćina, replikaciju virusa, modulaciju imunosnog odgovora i moguću ulogu u patogenezi. Otkriće nekih novih virusa koji bi se mogli pojaviti kao onečišćenja cjepiva i uz to imati moguću ulogu u patogenezi u ljudi zahtjeva i uvođenje postupaka i metoda za njihovu brzu detekciju. Upravo u tome prednost nad konvencionalnim pristupom imaju molekularno-biološke metode, temeljene na PCR-u koje su osjetljivije i brže. Međutim, PCR tehnike zahtjevaju individualan pristup pojedinom tipu/vrsti virusa što uključuje dizajn i procjenu valjanosti za svaki test. Dizajn PCR testa sastoji se od dizajna početnica, optimizacije i standardizacije PCR metode, identifikacije PCR produkta (pozitivni rezultati PCR provjeravaju se izravno sekvecioniranjem) te validacije PCR metode. Potrebno je raditi na cjelovitoj validaciji punog raspona testova uz puno znanstvenih istraživanja i ulaganja u edukaciju, automatizaciju i opremu da bi se navedene metode dalje razvijale (78). Osim molekularno-bioloških metoda temeljenih na PCR tehnici razvijaju se i

druge bioanalitičke metode kao što je MALDI-TOF masena spektrometrija. Prednost ove metodologije je visoka osjetljivost, točnost, brzina i mogućnost automatizacije procesa. Naime, istraživanja pokazuju da se MALDI-TOF MS platforma može primijeniti za simultanu detekciju različitih serotipova ili genotipova virusa pri čemu ne dolazi do križne reaktivnosti, što je često problem u detekciji virusa imunotestovima, a i vrijeme potrebno za analizu MALDI-TOF MS-om je znatno kraće u odnosu na konvencionalne metode u virologiji (Cobo, 2013). S druge strane, istraživanja pokazuju da je za detekciju virusa potrebno kombinirati PCR i MALDI-TOF MS platformu pri čemu se PCR koristi za umnažanje DNA, a TOF-MS za analizu tih umnoženih djelova DNA nakon čega slijedi usporedba dobivenih molekularnih masenih profila s postojećom bazom podataka. Upravo je nedostatak baza masenih spektara za sada jedan od većih ali ne i nepremostivih problema u primjeni ove bioanalitičke metode u detekciji virusa.

Razvojem proizvodnje cjepiva uvode se novi stanični supstrati (primjerice nove stanične linije dobivene iz tumorskih stanica sisavaca ili ptica koje potencijalno sadrže onkogene viruse; matične stanične linije koje potencijalno sadrže endogene i egzogene viruse, stanične linije dobivene genetičkim inženjerstvom koje potencijalno sadrže nove vrste virusa, stanične linije dobivene iz biljaka, insekata i bakterija koje potencijalno sadrže nepoznate viruse); zatim nove tehnologije proizvodnje cjepiva (primjerice uporaba virusnih vektora u proizvodnji) te nova otkrića detekcije nepoznatih virusnih onečišćenja u cjepivima (kao što je opisano u slučajevima onečišćenja SV 40 u atenuiranom i inaktiviranom cjepivu protiv poliomijelitisa te onečišćenje PCV-1 u cjepivu Rotarix) predstavljaju nove izazove za regulatorno propisane konvencionalne testove ispitivanja prisutnosti virusnih onečišćenja u cjepivima. U svrhu sigurne primjene novih staničnih supstrata uvedeni su i dodatni testovi za ispitivanje prisutnosti virusnih onečišćenja. Dodatni testovi ispitivanja prisutnosti onečišćenja u novim staničnim supstratima uključuju testove kemijske indukcije pomoću lijekova s različitim mehanizmima aktivacije virusa kako bi procijenili prisutnost latentnih, okultnih RNA virusa i onkogenih DNA virusa u novim staničnim supstratima. Uvedeni su *in vivo* testovi onkogenosti kako bi se ispitala prisutnost onkogenih virusa u staničnim linijama dobivenih iz tumorskih stanica sisavaca ili životinja. *In vivo* test onkogenosti provodi se inokulacijom staničnih lizata u tek okoćene zamorce,

miševe i štakore koji se promatraju kako bi se utvrdilo je li došlo do razvoja tumora u periodu od 4 do 7 mjeseci (79). Uvođenje novih staničnih supstrata kao i primjena kemijske indukcije za aktivaciju latentnih virusa (endogenih retrovirusa, okultnih i onkogenih virusa) uz primjenu konvencionalnih metoda kao što je PERT, TEM, test infektivnosti te PCR zahtjeva uvođenje naprednijih molekularno-bioanalitičkih metoda širokog spektra koje će biti primjenjive za analizu potencijalnih virusnih onečišćenja u cjepivima.

5 ZAKLJUČCI

- U RH na tržištu su trenutno cjepiva odobrena nacionalnim postupkom, postupkom međusobnog priznavanja ili decentraliziranim postupkom te centraliziranim postupkom davanja odobrenja.
- U razvoju i proizvodnji cjepiva koriste se biološki materijali životinjskog ili ljudskog podrijetla što može dovesti do onečišćenja cjepiva stranim agensima (virusom). Onečišćenje se može javiti u svim koracima proizvodnje od samog početnog materijala (matična sjemena serija ili radna sjemena serija) do gotovog proizvoda – cjepiva.
- Regulatorni zahtjevi koji su propisani s ciljem osiguravanja cjepiva od virusnih onečišćenja nalaze se u smjernicama regulatornih tijela kao što su EMA, FDA i organizacija kao što su SZO i ICH te u farmakopejama.
- Kako bi prilikom proizvodnje i kontrole kvalitete u proizvodnji virusnih cjepiva/bioloških lijekova osigurali odsutnost stranih agensa znanstveno regulatorne smjernice propisuju *in vivo* i *in vitro* testove na prisutnost stranih agensa (virusa). Konvencionalne metode ispitivanja u uvjetima *in vitro* i *in vivo* uključuju *in vitro* testove na staničnim kulturama i *in vivo* testove na glodavcima i pilećim embrijima. Konvencionalne metode za otkrivanje prisutnosti stranih agensa (virusa) u staničnim kulturama su transmisijska elektronska mikroskopija (TEM), ispitivanje aktivnosti reverzne transkriptaze (relevanto za retrovire) odnosno kvantitativna metoda PERT-test (engl. Product Enhanced Reverse Transcriptase, PERT- test) te ispitivanje infektivnosti u staničnim kulturama *in vitro* i testiranje infektivnosti u životinja *in vivo*. *In vitro*, u staničnim kulturama se mikroskopski analizira citopatološki učinak (CPE), te se testira prisutnosti hemaglutinirajućih (HA) ili hemadsorpirajućih (HAD) agensa. U testovima *in vivo* određene pokusne životinje se cijepu te se bilježi njihov mortalitet, a tkivo se testira na prisutnost HA.
- Prednost nad konvencionalnim pristupom detekcije stranih agensa-virusa imaju molekularno-biološke metode, temeljene na PCR-u koje su znatno osjetljivije, imaju široki spektar detekcije

i brže su. Tome treba pridodati razvoj bioanalitičkih metoda temeljenih na masenoj spektrometriji koje u kombinaciji s PCR-om pokazuju visoku osjetljivost, široki spektar, točnost, brzinu i mogućnosti automatizacije procesa. Uvođenje takvih metoda detekcije stranih agensa-virusa je potrebna radi savladavanja nedostataka konvencionalnih metoda u ispitivanju stranih agensa kao što su duže vrijeme testiranja jer se koriste žive životinje; mogući propusti u otkrivanju stranog agensa-virusa zbog nemogućnosti životinje zaražene određenim virusom da ne stvara humoralni imunosni odgovor ili nemogućnost otkrivanja nekih virusa koji se ne mogu razmnožavati u životinjama, a patogeni su za ljude.

6 LITERATURA

1. Kalenić S. Medicinska mikrobiologija: Medicinska naklada; 2013.
2. Francetić, . I. Farmakoterapijski priručnik. Medicinska naklada 2010. 422-3 p.
3. Kumru OS, Joshi SB, Smith DE, Middaugh CR, Prusik T, Volkin DB. Vaccine instability in the cold chain: mechanisms, analysis and formulation strategies. *Biologicals*. 2014;42(5):237-59.
4. Narodne novine (2013) Zakon o lijekovima. Zagreb: Narodne novine d.d., 79 (13).
5. Narodne novine (2013) Pravilnik o davanju odobrenja za stavljanje lijeka u promet. Zagreb: Narodne novine d.d., 83/2013
6. Amorij JP, Kersten GF, Saluja V, Tonniss WF, Hinrichs WL, Slutter B, et al. Towards tailored vaccine delivery: needs, challenges and perspectives. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society*. 2012;161(2):363-76.
7. Ljubin-Sternak S., B. K, T. V-Č, G. M-G. Eradikacija poliomijelitisa - korak do cilja. *Acta Med Croatica*. 2014.;68:327-35.
8. World Health Organization (WHO). Guideline on stability evaluation of vaccines. World Health Organization; Geneva, Switzerland, 2006.
9. European Pharmacopoeia. 8th ed. Strasbourg: Council of Europe; 2014.
10. Burke CJ, Hsu TA, Volkin DB. Formulation, stability, and delivery of live attenuated vaccines for human use. *Critical reviews in therapeutic drug carrier systems*. 1999;16(1):1-83.
11. Orme IM. Vaccine development for tuberculosis: current progress. *Drugs*. 2013;73(10):1015-24.
12. Kumar H, Kawai T, Akira S. Pathogen recognition by the innate immune system. *International reviews of immunology*. 2011;30(1):16-34.
13. Hafner A, Lovric J, Lakos GP, Pepic I. Nanotherapeutics in the EU: an overview on current state and future directions. *International journal of nanomedicine*. 2014;9:1005-23.
14. Yoo JW, Irvine DJ, Discher DE, Mitragotri S. Bio-inspired, bioengineered and biomimetic drug delivery carriers. *Nature reviews Drug discovery*. 2011;10(7):521-35.
15. Kniskern PJ, Marburg S, Ellis RW. Haemophilus influenzae type b conjugate vaccines. *Pharmaceutical biotechnology*. 1995;6:673-94.
16. Guy B. The perfect mix: recent progress in adjuvant research. *Nature reviews Microbiology*. 2007;5(7):505-17.
17. Brito LA, O'Hagan DT. Designing and building the next generation of improved vaccine adjuvants. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society*. 2014;190:563-79.
18. Glenney, A.T., sur. i. The antigenic value of toxoid precipitated by potassium alum. *J. Pathol. Bacteriol*. 1926;29:31-40
19. O'Hagan DT, De Gregorio E. The path to a successful vaccine adjuvant--'the long and winding road'. *Drug discovery today*. 2009;14(11-12):541-51.
20. Freund, J., al. e. Sensitization and antibody formation after injection of tubercle bacilli and paraffin oil. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1937;37:509-13.
21. Allison, A.G., Gregoriadis, G. Liposomes as immunological adjuvants. *Nature* 252. 1974;252.
22. Hem SL, Hogenesch H. Relationship between physical and chemical properties of aluminum-containing adjuvants and immunopotentiality. *Expert review of vaccines*. 2007;6(5):685-98.
23. O'Hagan DT, Ott GS, Nest GV, Rappuoli R, Giudice GD. The history of MF59((R)) adjuvant: a phoenix that arose from the ashes. *Expert review of vaccines*. 2013;12(1):13-30.
24. De Gregorio E, Tritto E, Rappuoli R. Alum adjuvant activity: unraveling a century old mystery. *European journal of immunology*. 2008;38(8):2068-71.
25. Nohynek H, Jokinen J, Partinen M, Vaarala O, Kirjavainen T, Sundman J, et al. AS03 adjuvanted A/H1N1 vaccine associated with an abrupt increase in the incidence of childhood narcolepsy in Finland. *PloS one*. 2012;7(3):e33536.
26. Watson DS, Endsley AN, Huang L. Design considerations for liposomal vaccines: influence of formulation parameters on antibody and cell-mediated immune responses to liposome associated antigens. *Vaccine*. 2012;30(13):2256-72.

27. Szoka F, Jr., Papahadjopoulos D. Comparative properties and methods of preparation of lipid vesicles (liposomes). *Annual review of biophysics and bioengineering*. 1980;9:467-508.
28. HogenEsch H. Mechanisms of stimulation of the immune response by aluminum adjuvants. *Vaccine*. 2002;20 Suppl 3:S34-9.
29. Jain S, O'Hagan DT, Singh M. The long-term potential of biodegradable poly(lactide-co-glycolide) microparticles as the next-generation vaccine adjuvant. *Expert review of vaccines*. 2011;10(12):1731-42.
30. Leserman L. Liposomes as protein carriers in immunology. *Journal of liposome research*. 2004;14(3-4):175-89.
31. O'Hagan DT, Singh M. Microparticles as vaccine adjuvants and delivery systems. *Expert review of vaccines*. 2003;2(2):269-83.
32. Garcia A, Lema D. An Updated Review of ISCOMSTM and ISCOMATRIXTM Vaccines. *Current pharmaceutical design*. 2016;22(41):6294-9.
33. Offit PA, Jew RK. Addressing parents' concerns: do vaccines contain harmful preservatives, adjuvants, additives, or residuals? *Pediatrics*. 2003;112(6 Pt 1):1394-7.
34. Arakawa T, Tsumoto K, Kita Y, Chang B, Ejima D. Biotechnology applications of amino acids in protein purification and formulations. *Amino acids*. 2007;33(4):587-605.
35. Arakawa T, Ejima D, Tsumoto K, Obeyama N, Tanaka Y, Kita Y, et al. Suppression of protein interactions by arginine: a proposed mechanism of the arginine effects. *Biophysical chemistry*. 2007;127(1-2):1-8.
36. Chen Z, He Y, Shi B, Yang D. Human serum albumin from recombinant DNA technology: challenges and strategies. *Biochimica et biophysica acta*. 2013;1830(12):5515-25.
37. Ragan DL, Boreiko CJ. Initiation of C3H/10T1/2 cell transformation by formaldehyde. *Cancer letters*. 1981;13(4):325-31.
38. Natarajan AT, Darroudi F, Bussman CJ, van Kesteren-van Leeuwen AC. Evaluation of the mutagenicity of formaldehyde in mammalian cytogenetic assays in vivo and vitro. *Mutation research*. 1983;122(3-4):355-60.
39. Epidemiology of chronic occupational exposure to formaldehyde: report of the Ad Hoc Panel on Health Aspects of Formaldehyde. Universities Associated for Research and Education in Pathology, Inc. *Toxicology and industrial health*. 1988;4(1):77-90.
40. Heck HD, Casanova-Schmitz M, Dodd PB, Schachter EN, Witek TJ, Tosun T. Formaldehyde (CH₂O) concentrations in the blood of humans and Fischer-344 rats exposed to CH₂O under controlled conditions. *American Industrial Hygiene Association journal*. 1985;46(1):1-3.
41. Anderson JA, Adkinson NF, Jr. Allergic reactions to drugs and biologic agents. *Jama*. 1987;258(20):2891-9.
42. Goh CL. Anaphylaxis from topical neomycin and bacitracin. *The Australasian journal of dermatology*. 1986;27(3):125-6.
43. James JM, Zeiger RS, Lester MR, Fasano MB, Gern JE, Mansfield LE, et al. Safe administration of influenza vaccine to patients with egg allergy. *The Journal of pediatrics*. 1998;133(5):624-8.
44. James JM, Burks AW, Roberson PK, Sampson HA. Safe administration of the measles vaccine to children allergic to eggs. *The New England journal of medicine*. 1995;332(19):1262-6.
45. Agencija za lijekove i medicinske proizvode (HALMED). Baza lijekova [Available from: <http://www.halmed.hr/Lijekovi/Baza-lijekova/> pristupljeno 19.9.2016.
46. Ambrose CS, Luke C, Coelingh K. Current status of live attenuated influenza vaccine in the United States for seasonal and pandemic influenza. *Influenza and other respiratory viruses*. 2008;2(6):193-202.
47. Center for Biologics Evaluation and Research (CBER). Guidance for Industry: Characterization and Qualification of Cell Substrates and Other Biological Materials Used in the Production of Viral Vaccines for Infectious Disease Indications; FDA: Rockville, MD, February 2010 [Available from: <http://www.fda.gov/downloads/BiologicsBloodVaccines/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/Vaccines/UCM202439.pdf> pristupljeno 19.9.2016.
48. Aubrit F, Perugi F, Leon A, Guehenneux F, Champion-Arnaud P, Lahmar M, et al. Cell substrates for the production of viral vaccines. *Vaccine*. 2015;33(44):5905-12.

49. Baylor NW. The Regulatory Evaluation of Vaccines for Human Use. Methods in molecular biology (Clifton, NJ). 2016;1404:773-87.
50. International Conference on Harmonisation. ICH Topics Q5A(R1)- Viral safety evaluation of biotechnology products derived from cell lines of human or animal origin. Current Step 4 version. 23 Sept 1999.
- [Available from:
http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/09/WC500002801.pdf pristupljeno 21.9.2016.
51. Goodpasture EW, Woodruff AM, Buddingh GJ. THE CULTIVATION OF VACCINE AND OTHER VIRUSES IN THE CHORIOALLANTOIC MEMBRANE OF CHICK EMBRYOS. Science (New York, NY). 1931;74(1919):371-2.
52. Montomoli E, Khadang B, Piccirella S, Trombetta C, Mennitto E, Manini I, et al. Cell culture-derived influenza vaccines from Vero cells: a new horizon for vaccine production. Expert review of vaccines. 2012;11(5):587-94.
53. Fedson DS. NEW technologies for meeting the global demand for pandemic influenza vaccines. Biologicals. 2008;36(6):346-9.
54. Sheets, R. Food and Drug Administration History and characterization of the Verocell line for the Vaccines and Related Biological Products Advisory Committee Meeting to be held on May 12, 2000 2010 [Available from: <http://www.fda.gov/ohrms/dockets/ac/00/backgrd/3616b1a.pdf>. Accessed 21. rujen 2016.
55. Brown SW, Mehtali M. The Avian EB66(R) Cell Line, Application to Vaccines, and Therapeutic Protein Production. PDA journal of pharmaceutical science and technology / PDA. 2010;64(5):419-25.
56. Hess RD, Weber F, Watson K, Schmitt S. Regulatory, biosafety and safety challenges for novel cells as substrates for human vaccines. Vaccine. 2012;30(17):2715-27.
57. Coecke S, Balls M, Bowe G, Davis J, Gstraunthaler G, Hartung T, et al. Guidance on good cell culture practice. a report of the second ECVAM task force on good cell culture practice. Alternatives to laboratory animals : ATLA. 2005;33(3):261-87.
58. Lewis AM, Jr., Krause P, Peden K. A defined-risks approach to the regulatory assessment of the use of neoplastic cells as substrates for viral vaccine manufacture. Developments in biologicals. 2001;106:513-35.
59. Pastoret PP. Human and animal vaccine contaminations. Biologicals. 2010;38(3):332-4.
60. Farsang A, Kulcsar G. Extraneous agent detection in vaccines--a review of technical aspects. Biologicals. 2012;40(4):225-30.
61. International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV) [Available from: <https://talk.ictvonline.org/> pristupljeno 22.6.2017.
62. Domingo E. Mechanisms of viral emergence. Veterinary research. 2010;41(6):38.
63. Knezevic I, Stacey G, Petricciani J. WHO Study Group on cell substrates for production of biologicals, Geneva, Switzerland, 11-12 June 2007. Biologicals. 2008;36(3):203-11.
64. European Commission: EudraLex - Volume 4 Good manufacturing practice (GMP) Guidelines. [Available from: http://ec.europa.eu/health/documents/eudralex/vol-4/index_en.htm pristupljeno 23.9.2016.
65. Jungback C, Motitschke A. Extraneous agents testing for substrates of avian origin and viral vaccines for poultry: current provisions and proposals for future approaches. Biologicals. 2010;38(3):362-5.
66. Farson D, Tao L, Ko D, Li Q, Brignetti D, Segawa K, et al. Development of novel E1-complementary cells for adenoviral production free of replication-competent adenovirus. Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy. 2006;14(2):305-11.
67. 5.2.3 Cell Substrates for the Production of Vaccines for Human Use. European Pharmacopoeia, 8th ed. 2014

68. Masters JR, Thomson JA, Daly-Burns B, Reid YA, Dirks WG, Packer P, et al. Short tandem repeat profiling provides an international reference standard for human cell lines. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2001;98(14):8012-7.
69. World Health Organization (WHO). Recommendations for the evaluation of animal cell cultures as cell substrates for the manufacture of biological medicinal products and for the characterization of cell banks. Sixty-First Report; World Health Organization, Annex 3, WHO Technical Report Series No. 878; Geneva, Switzerland, 2013. [Available from: http://www.who.int/biologicals/vaccines/TRS_978_Annex_3.pdf pristupljeno 20.9.2016.
70. Gombold J, Karakasidis S, Niksa P, Podczasy J, Neumann K, Richardson J, et al. Systematic evaluation of in vitro and in vivo adventitious virus assays for the detection of viral contamination of cell banks and biological products. *Vaccine*. 2014;32(24):2916-26.
71. Mallet L, Gisonni-Lex L. Need for new technologies for detection of adventitious agents in vaccines and other biological products. *PDA journal of pharmaceutical science and technology / PDA*. 2014;68(6):556-62.
72. Sharma PK, Reilly MJ, Bhatia SK, Sakhitab N, Archambault JD, Bhatia SR. Effect of pharmaceuticals on thermoreversible gelation of PEO-PPO-PEO copolymers. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2008;63(2):229-35.
73. Mezmarich NAK, Juggernaut KA, Batzli KM, Love BJ. Structural Changes in PEO-PPO-PEO Gels Induced by Methylparaben and Dexamethasone Observed Using Time-Resolved SAXS. *Macromolecules*. 2011;44(19):7792-8.
74. 2.6.16, Tests for Extraneous Agents in Viral Vaccines for Human Use. *European Pharmacopoeia*, 8th ed., 2014
75. Gregersen JP. Theory and practice of conventional adventitious virus testing. *PDA journal of pharmaceutical science and technology / PDA*. 2011;65(6):634-44.
76. Bierley ST, Raineri R, Poiley JA, Morgan EM. A comparison of methods for the estimation of retroviral burden. *Developments in biological standardization*. 1996;88:163-5.
77. Goldsmith CS, Miller SE. Modern uses of electron microscopy for detection of viruses. *Clinical microbiology reviews*. 2009;22(4):552-63.
78. Ottiger HP. Development, standardization and assessment of PCR systems for purity testing of avian viral vaccines. *Biologicals*. 2010;38(3):381-8.
79. Khan AS. Current testing methods and challenges for detection of adventitious viruses. *PDA journal of pharmaceutical science and technology / PDA*. 2011;65(6):627-33.
80. World Health Organization (WHO). Recommendations for the evaluation of animal cell cultures as cell substrates for the manufacture of biological medicinal products and for the characterization of cell banks. Sixty-First Report; World Health Organization, Annex 1, WHO Technical Report Series No. 878; Geneva, Switzerland, 2010. [Available from: http://www.who.int/biologicals/vaccines/TRS_978_Annex_3.pdf pristupljeno 20.9.2016. [Available from: http://www.who.int/biologicals/Cell_Substrates_clean_version_18_April.pdf pristupljeno 20.09.2016.
81. Sastry L, Xu Y, Duffy L, Koop S, Jasti A, Roehl H, et al. Product-enhanced reverse transcriptase assay for replication-competent retrovirus and lentivirus detection. *Human gene therapy*. 2005;16(10):1227-36.
82. Cobo F. Application of maldi-tof mass spectrometry in clinical virology: a review. *The open virology journal*. 2013;7:84-90.
83. Singhal N, Kumar M, Kanaujia PK, Viridi JS. MALDI-TOF mass spectrometry: an emerging technology for microbial identification and diagnosis. *Frontiers in microbiology*. 2015;6:791.
84. Antolovic IM, Burri S, Hoebe RA, Maruyama Y, Bruschini C, Charbon E. Photon-Counting Arrays for Time-Resolved Imaging. *Sensors (Basel, Switzerland)*. 2016;16(7).
85. Keys CJ, Dare DJ, Sutton H, Wells G, Lunt M, McKenna T, et al. Compilation of a MALDI-TOF mass spectral database for the rapid screening and characterisation of bacteria implicated in human infectious diseases. *Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases*. 2004;4(3):221-42.

86. Calderaro A, Arcangeletti MC, Rodighiero I, Buttrini M, Gorrini C, Motta F, et al. Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight (MALDI-TOF) mass spectrometry applied to virus identification. *Scientific reports*. 2014;4:6803.
87. Chou TC, Hsu W, Wang CH, Chen YJ, Fang JM. Rapid and specific influenza virus detection by functionalized magnetic nanoparticles and mass spectrometry. *Journal of nanobiotechnology*. 2011;9:52.
88. Yi X, Li J, Yu S, Zhang A, Xu J, Yi J, et al. A new PCR-based mass spectrometry system for high-risk HPV, part I: methods. *American journal of clinical pathology*. 2011;136(6):913-9.
89. Sjöholm MI, Dillner J, Carlson J. Multiplex detection of human herpesviruses from archival specimens by using matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *Journal of clinical microbiology*. 2008;46(2):540-5.
90. Zurcher S, Mooser C, Luthi AU, Muhlemann K, Barbani MT, Mohacsi P, et al. Sensitive and rapid detection of ganciclovir resistance by PCR based MALDI-TOF analysis. *Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology*. 2012;54(4):359-63.
91. Meiering CD, Linial ML. Historical perspective of foamy virus epidemiology and infection. *Clinical microbiology reviews*. 2001;14(1):165-76.
92. Oehmig A, Buttner M, Weiland F, Werz W, Bergemann K, Pfaff E. Identification of a calicivirus isolate of unknown origin. *The Journal of general virology*. 2003;84(Pt 10):2837-45.
93. Urisman A, Molinaro RJ, Fischer N, Plummer SJ, Casey G, Klein EA, et al. Identification of a novel Gammaretrovirus in prostate tumors of patients homozygous for R462Q RNASEL variant. *PLoS pathogens*. 2006;2(3):e25.
94. Kulcsar G, Farsang A, Soos T. Testing for viral contaminants of veterinary vaccines in Hungary. *Biologicals*. 2010;38(3):346-9.
95. Liu L, Kampa J, Belak S, Baule C. Virus recovery and full-length sequence analysis of atypical bovine pestivirus Th/04_KhonKaen. *Veterinary microbiology*. 2009;138(1-2):62-8.
96. Petricciani J, Sheets R, Griffiths E, Knezevic I. Adventitious agents in viral vaccines: lessons learned from 4 case studies. *Biologicals*. 2014;42(5):223-36.
97. Tischer I, Rasch R, Tochtermann G. Characterization of papovavirus-and picornavirus-like particles in permanent pig kidney cell lines. *Zentralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde, Infektionskrankheiten und Hygiene Erste Abteilung Originale Reihe A: Medizinische Mikrobiologie und Parasitologie*. 1974;226(2):153-67.
98. Allan G, Krakowka S, Ellis J, Charreyre C. Discovery and evolving history of two genetically related but phenotypically different viruses, porcine circoviruses 1 and 2. *Virus research*. 2012;164(1-2):4-9.
99. Buhk, H.J., Tischer, I., Koch, M.A., 1985. Cloning and sequencing of the porcine circovirus PCV genome. *Zentralbl. Bakteriolog. Orig. A* 260, 465
100. Victoria JG, Wang C, Jones MS, Jaing C, McLoughlin K, Gardner S, et al. Viral nucleic acids in live-attenuated vaccines: detection of minority variants and an adventitious virus. *Journal of virology*. 2010;84(12):6033-40.
101. FDA. Memorandum: clinical review of New Biologics License application e Rotateg (Description of the product). Page 12 [Available from: <http://www.fda.gov/downloads/BiologicsBloodVaccines/Vaccines/ApprovedProducts/UCM142304.pdf> pristupljeno 19.9.2016.